

日 本 国 特 許 庁

JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類は下記の出願書類の謄本に相違ないことを証明する。
This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2002年 8月 1日

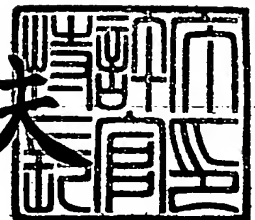
出 願 番 号
Application Number: PCT/JPO2/07874

出 願 人
Applicant (s): 株式会社医学生物学研究所
国立療養所中部病院長が代表する日本国
柳澤 勝彦
柴田 昌夫

2004 年 2 月 26 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今 井 康 夫



出証平 16-500057

特許協力条約に基づく国際出願願書

原本（出願用） - 印刷日時 2002年07月31日 (31.07.2002) 水曜日 09時53分17秒

P0102401

0	受理官庁記入欄	
0-1	国際出願番号.	PCT/JP 02/07874
0-2	国際出願日	01.08.02
0-3	(受付印)	PCT International Application 日本国特許庁
0-4	様式-PCT/RO/101 この特許協力条約に基づく国際出願願書は、 0-4-1 右記によって作成された。	PCT-EASY Version 2.92 (updated 01.06.2002)
0-5	申立て 出願人は、この国際出願が特許協力条約に従って処理されることを請求する。	
0-6	出願人によって指定された受理官庁	日本国特許庁 (RO/JP)
0-7	出願人又は代理人の書類記号	P0102401
I	発明の名称	GM1ガングリオシド結合型アミロイドβタンパク質を認識する抗体、及び該抗体をコードするDNA
II	出願人	出願人である (applicant only)
II-1	この欄に記載した者は	米国を除くすべての指定国 (all designated States except US)
II-2	右の指定国についての出願人である。	株式会社医学生物学研究所
II-4ja	名称	MEDICAL & BIOLOGICAL LABORATORIES CO., LTD.
II-4en	Name	460-0002 日本国
II-5ja	あて名:	愛知県 名古屋市
II-5en	Address:	中区丸の内三丁目5番10号 住友商事丸の内ビル5階 5F, Sumitomoshoji Marunouchi Bldg., 5-10, Marunouchi 3-chome, Naka-ku, Nagoya-shi, Aichi 460-0002 Japan
II-6	国籍 (国名)	日本国 JP
II-7	住所 (国名)	日本国 JP
II-8	電話番号	052-971-2081
II-9	ファクシミリ番号	052-971-2337

特許協力条約に基づく国際出願願書

原本（出願用） - 印刷日時 2002年07月31日（31.07.2002）水曜日 09時53分17秒

P0102401

III-1	その他の出願人又は発明者	
III-1-1	この欄に記載した者は	出願人である (applicant only)
III-1-2	右の指定国についての出願人である。	米国を除くすべての指定国 (all designated States except US)
III-1-4j a	名称	国立療養所中部病院長 <i>が代表する日本国</i>
III-1-4e n	Name <i>Japan as represented by the</i>	<i>The</i> director of Chubu National Hospital
III-1-5j a	あて名:	474-0031 日本国 愛知県 大府市 森岡町源吾36-3
III-1-5e n	Address:	36-3, Gengo, Morioka-cho, Obu-shi, Aichi 474-0031 Japan
III-1-6	国籍 (国名)	日本国 JP
III-1-7	住所 (国名)	日本国 JP
III-2	その他の出願人又は発明者	
III-2-1	この欄に記載した者は	出願人及び発明者である (applicant and inventor)
III-2-2	右の指定国についての出願人である。	すべての指定国 (all designated States)
III-2-4j a	氏名 (姓名)	柳澤 勝彦
III-2-4e n	Name (LAST, First)	YANAGISAWA, Katsuhiko
III-2-5j a	あて名:	474-0031 日本国 愛知県 大府市 森岡町源吾36-3
III-2-5e n	Address:	36-3, Gengo, Morioka-cho, Obu-shi, Aichi 474-0031 Japan
III-2-6	国籍 (国名)	日本国 JP
III-2-7	住所 (国名)	日本国 JP
III-3	その他の出願人又は発明者	
III-3-1	この欄に記載した者は	出願人及び発明者である (applicant and inventor)
III-3-2	右の指定国についての出願人である。	米国のみ (US only)
III-3-4j a	氏名 (姓名)	柴田 昌夫
III-3-4e n	Name (LAST, First)	SHIBATA, Masao
III-3-5j a	あて名:	396-0002 日本国 長野県 伊那市 大字手良沢岡字大原1063-103 株式会社医学生物学研究所内
III-3-5e n	Address:	<i>1063-103, Azaohara, Ozaterasawaoka,</i> MEDICAL & BIOLOGICAL LABORATORIES CO., LTD., Ina-shi, Nagano 396-0002 Japan
III-3-6	国籍 (国名)	日本国 JP
III-3-7	住所 (国名)	日本国 JP

特許協力条約に基づく国際出願願書

P0102401

原本（出願用） - 印刷日時 2002年07月31日 (31.07.2002) 水曜日 09時53分17秒

IV-1	代理人又は共通の代表者、通知のあて名 下記の者は国際機関において右記のごとく出願人のために行動する。	代理人 (agent)
IV-1-1ja	氏名(姓名)	小西 富雅
IV-1-1en	Name (LAST, First)	KONISHI, Tomimasa
IV-1-2ja	あて名:	460-0002 日本国 愛知県 名古屋市 中区丸の内二丁目17番12号 丸の内エステートビル7階
IV-1-2en	Address:	7F Marunouchi Estate Bldg., 17-12, Marunouchi 2-chome, Naka-ku, Nagoya-shi, Aichi 460-0002 Japan
IV-1-3	電話番号	052-201-2055
IV-1-4	ファクシミリ番号	052-201-2056
IV-2	その他の代理人	筆頭代理人と同じあて名を有する代理人 (additional agent(s) with same address as first named agent)
IV-2-1ja	氏名	萩野 幹治
IV-2-1en	Name(s)	HAGINO, Mikiharu
V	国の指定	
V-1	広域特許 (他の種類の保護又は取扱いを求める場合には括弧内に記載する。)	AP: GH GM KE LS MW MZ SD SL SZ TZ UG ZM ZW 及びハアレプロトコルと特許協力条約の締約国である他の国 EA: AM AZ BY KG KZ MD RU TJ TM 及びユーラシア特許条約と特許協力条約の締約国である他の国 EP: AT BE BG CH&LI CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR IE IT LU MC NL PT SE SK TR 及びヨーロッパ特許条約と特許協力条約の締約国である他の国 OA: BF BJ CF CG CI CM GA GN GQ GW ML MR NE SN TD TG 及びアフリカ知的所有権機構と特許協力条約の締約国である他の国
V-2	国内特許 (他の種類の保護又は取扱いを求める場合には括弧内に記載する。)	AE AG AL AM AT AU AZ BA BB BG BR BY BZ CA CH&LI CN CO CR CU CZ DE DK DM DZ EC EE ES FI GB GD GE GH GM HR HU ID IL IN IS JP KE KG KP KR KZ LC LK LR LS LT LU LV MA MD MG MK MN MW MX MZ NO NZ OM PH PL PT RO RU SD SE SG SI SK SL TJ TM TN TR TT TZ UA UG US UZ VN YU ZA ZM ZW
V-5	指定の確認の宣言 出願人は、上記の指定に加えて、規則4.9(b)の規定に基づき、特許協力条約のもとで認められる他の全ての国の指定を行う。ただし、V-6欄に示した国の指定を除く。出願人は、これらの追加される指定が確認を条件としていること、並びに優先日から15月が経過する前にその確認がなされない指定は、この期間の経過時に、出願人によって取り下げられたものとみなされることを宣言する。	

特許協力条約に基づく国際出願願書

P0102401

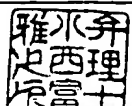

原本（出願用） - 印刷日時 2002年07月31日（31.07.2002）水曜日 09時53分17秒

V-6	指定の確認から除かれる国	なし (NONE)	
VI-1	先の国内出願に基づく優先権主張		
VI-1-1	出願日	2001年08月03日 (03.08.2001)	
VI-1-2	出願番号	特願2001-235700	
VI-1-3	国名	日本国 JP	
VI-2	優先権証明書送付の請求 上記の先の出願のうち、右記の番号のものについては、出願書類の認証謄本を作成し国際事務局へ送付することを、受理官庁に対して請求している。	VI-1	
VII-1	特定された国際調査機関 (ISA)	日本国特許庁 (ISA/JP)	
VIII	申立て	申立て数	
VIII-1	発明者の特定に関する申立て	-	
VIII-2	出願し及び特許を与えられる国際出願日における出願人の資格に関する申立て	-	
VIII-3	先の出願の優先権を主張する国際出願日における出願人の資格に関する申立て	-	
VIII-4	発明者である旨の申立て（米国を指定国とする場合）	-	
VIII-5	不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する申立て	-	
IX	照合欄	用紙の枚数	添付された電子データ
IX-1	願書（申立てを含む）	5	-
IX-2	明細書（配列表を除く）	36	-
IX-3	請求の範囲	5	-
IX-4	要約	1	EZABST00.TXT
IX-5	図面	7	-
IX-7a	国際出願に含まれる用紙の枚数（明細書の配列表を除く）	54	
IX-6	明細書の配列表	7	-
IX-7	合計	61	
	添付書類	添付	添付された電子データ
IX-8	手数料計算用紙	✓	-
IX-16	コンピュータ読み取り可能なヌクレオチド又はアミノ酸配列表		
IX-16-(ii)	規則13の3に基づき提出する国際調査のための写しを含む追加的写し	-	1 フレキシブルディスク
IX-16-(iii)	国際調査のための写しの同一性、又は第IX欄に記載した配列表部分を含む写しの同一性についての陳述書を添付	✓	-
IX-17	PCT-EASYディスク	-	フレキシブルディスク
IX-18	その他	納付する手数料に相当する特許印紙を貼付した書面	-
IX-18	その他	国際事務局の口座への振り込みを証明する書面	-
IX-18	その他	FDの情報を記載した書面	-

特許協力条約に基づく国際出願願書

P0102401

原本（出願用） - 印刷日時 2002年07月31日（31.07.2002）水曜日 09時53分17秒

IX-19	要約書とともに提示する図の番号	なし
IX-20	国際出願の使用言語名:	日本語
X-1	提出者の記名押印	
X-1-1	氏名(姓名)	小西 富雅
X-2	提出者の記名押印	
X-2-1	氏名(姓名)	萩野 幹治

受理官庁記入欄

10-1	国際出願として提出された書類の実際の受理の日	01.08.02
10-2	図面:	
10-2-1	受理された	
10-2-2	不足図面がある	
10-3	国際出願として提出された書類を補完する書類又は図面であってその後期間内に提出されたものの実際の受理の日（訂正日）	
10-4	特許協力条約第11条(2)に基づく必要な補完の期間内の受理の日	
10-5	出願人により特定された国際調査機関	ISA/JP
10-6	調査手数料未払いにつき、国際調査機関に調査用写しを送付していない	

国際事務局記入欄

11-1	記録原本の受理の日	
------	-----------	--

明 細 書

GM1 ガングリオシド結合型アミロイドβタンパク質を認識する抗体、及び該抗体をコードする DNA

5

技術分野

本発明は、抗体及びそれをコードする遺伝子に関する。詳しくは、アルツハイマー病に関連する抗体及びそれをコードする遺伝子に関する。

10 背景技術

現在、日本はかつて無いスピードで人口の高齢化が進展しており、それと共に痴呆症患者の数も増えつつある。国立社会保障・人口問題研究所の調査によれば、痴呆症患者数は西暦 2000 年には 165 万人、2015 年には 264 万人に及ぶと見積もられている。これら痴呆性疾患の患者の介護は経済的にも大きな負担となることから、一日も早い有効な治療法の開発が望まれている。

15

老人性痴呆症のうち、主要なものはアルツハイマー病（AD）であり、本疾患の病態生理の全体像は依然不明であるが、研究は急速に進展している。アルツハイマー病患者に共通してみられる特徴としては（１）脳の萎縮（２）老人斑と呼ばれる斑状の蓄積物の形成を認めること（３）神経細胞内に繊維状の物質が蓄積した

20

神経原繊維変化、の３つがあり、この３つを認める場合にアルツハイマー病と診断される。しかし、（１）の脳の萎縮を除き老人斑の形成や神経原繊維の変化は外部からの観察によっては知ることができず、このことがアルツハイマー病の診断を困難なものにしている。従って、分子遺伝学的マーカーや生化学的マーカーなど、十分な特異性と感度を持った、アルツハイマー病の診断のための生物学的マ

25

ーカーの開発が望まれている。

アルツハイマー病の臨床症状である痴呆と密接に結びついているのが神経細胞の脱落であるが、神経細胞の脱落がどのような理由で起こるかについて、上記の病理変化が重要な手がかりを与える。1990年代後半からの研究の進展により、老人斑がアミロイド β タンパク($A\beta$)と呼ばれるペプチドが凝集して沈着したものであることが明らかになった。一方、神経原繊維変化は神経細胞の骨格タンパク質の一つである tau タンパク質がリン酸化されて細胞内で凝集しているものであることが明らかにされた。

アルツハイマー病には遺伝的要因によって引き起こされる家族性アルツハイマーと、遺伝的背景を持たない孤発性アルツハイマーが知られており、家族性アルツハイマーの原因遺伝子や危険因子が明らかにされつつある。家族性アルツハイマーの原因遺伝子の一つにアミロイド前駆体タンパク質(Amyloid Precursor Protein ; APP)をコードする遺伝子があり、この遺伝子に突然変異があると必ずアルツハイマー病を引き起こすことが知られている。従って、これら変異体の作用、機能を見出せばアルツハイマー病の発症機構が明らかになると考えられる。家族性アルツハイマーと孤発性アルツハイマーの間には共通の機構が存在すると予測されるため、家族性アルツハイマー病の発症機構の研究から孤発性アルツハイマーの場合にも適用できる機構が浮かび上がってくると考えられる。

$A\beta$ は APP から β 及び γ セクレターゼによって切り出されるが、 $A\beta$ には切断点の違いにより $A\beta_{40}$ と $A\beta_{42}$ が存在し、 $A\beta_{42}$ の方が $A\beta_{40}$ よりも凝集しやすいこと、また病理学的観察により $A\beta_{42}$ が最初に凝集し、この $A\beta_{42}$ を核として $A\beta_{40}$ が凝集して繊維形成が進むという説が提唱されている。最近の本発明者らの研究によれば、AD の脳において GM1 ガングリオシド(GM1)に結合することによって $A\beta$ の沈着が開始するとの知見が得られている(K. Yanagisawa, A. Odaka, N. Suzuki, Y. Ihara, Nat. Med. 1, 1062 (1995)、K. Yanagisawa, Y. Ihara, Neurobiol. Aging 19, S65 (1998))。また、本発明者らは、GM1 結合型 $A\beta$ を特異的に認識するモノク

ローナル抗体 (4396 抗体) の作製に成功したことを報告した (FEBS Letters 420, 43-46 (1997))。本発明者らは、GM1 結合型 A β のユニークな分子特性に基づき、A β が GM1 への結合によって構造を変化させ、そしてアミロイド繊維形成の種 (シード) として働くという仮説を立てた。その後、複数の研究者が *in vitro* での研究を行い、この仮説を支持する結果、即ち、A β は膜上において GM1 に特異的に結合すること、GM1 を含有するリボソームの添加によって可溶性の A β が凝集を開始しアミロイド繊維を形成することが示されている。(J. McLaurin, A. Chakrabartty, J. Biol. Chem. 271, 26482 (1996)、P. Choo-Smith, W. K. Surewicz, FEBS Lett. 402, 95 (1997)、P. Choo-Smith, W. Garzon-Rodriguez, C. G. Globe, W. K. Surewicz, J. Biol. Chem. 272, 22987 (1997)、K. Matsuzaki, C. Horikiri, Biochemistry 38, 4137 (1999)、V. Koppaka, P. H. Axelsen, Biochemistry 39, 10011 (2000))。

一方、GM1 と A β とが複合体を形成する分子メカニズムについて、A β の GM1 への結合が、結合する膜のコレステロールの濃度に依存していること、即ち、高濃度のコレステロールにより膜上の GM1 「クラスター」の形成が促され、これにより A β と GM1 との結合が促進されることが報告されている (A. Kakio, S. Nishimoto, K. Yanagisawa, Y. Kozutumi, K. Matsuzaki, J. Biol. Chem. 276, 24985 (2001))。また、シナプス膜の exofacial leaflets におけるコレステロール濃度は加齢及び／又はアポリポタンパク質 E (Apo E) の欠乏とともに有意に増加することから (U. Igbarova, N. A. Avdulov, F. Schroeder, W. G. Wood, J. Neurochem. 66, 1717 (1996)、U. Igbarova, N. A. Avdulov, S. V. Chochina, W. G. Wood, J. Neurochem. 69, 1661 (1997))、A β は老化脳のシナプス膜において GM1 に結合することが推測された。一方、GM1 及びコレステロールを豊富に含む膜ドメイン (rafts と呼ばれる) は生理的に多量の A β を含有し、かつある種の家族性アルツハイマー病モデルマウスにおいて不溶性 A β を蓄積することから、A β はこの膜ドメイン (rafts) において GM1 に結合する可能性も推測された (R. G. Parton, J. Histochem. Cytochem. 42, 155 (1994)、

K.Simons, E.Ikonen, Nature 387, 569 (1997)、S.J.Lee et al., Nat. Med. 4, 730 (1998)、
M. Morishima-Kawashima, Y.Ihara, Biochemistry 37, 15274 (1998)、N.Sawamura et al.,
J. Biol. Chem. 275, 27901 (2000))。

5 発明の開示

本発明は以上の背景に鑑みなされたものであり、アルツハイマー病の治療、診断、又は予防に有効な手段を提供することを目的とし、具体的にはアルツハイマー病の治療等に有効な抗体及びこれをコードする DNA、並びに薬剤のスクリーニング方法、及び薬剤を提供することを目的とする。

- 10 まず、本発明者らは GM1 結合型 A β を認識する上記抗体 (4396 抗体) のクラスを同定した。その結果、抗体は IgM クラス、L 鎖は λ 鎖であった。次に、H 鎖 (重鎖) 及び L 鎖 (軽鎖) の可変領域をコードする DNA の配列を決定することを試み、これに成功した。H 鎖及び L 鎖について CDR の DNA 配列の同定も併せて行った。続いて、H 鎖可変領域をコードする DNA を合成し、これにマウス IgG2a 定常領域
- 15 をコードする DNA をライゲーションした後、発現ベクターに組み込み H 鎖発現ベクターを作製した。同様に、L 鎖をコードする DNA を組込んだベクター (L 鎖発現ベクター) を作製した。これらのベクターを CHO 細胞にトランスフェクトして得られた形質転換体の中で抗体産生能の高いものを選択し、その培養上清を回収、精製することにより、4396 抗体の可変領域を有する IgG 型抗体 (以下、「4396C
- 20 抗体」ともいう) を得ることに成功した。

一方、4396C 抗体の免疫学的特性を検討するとともに、当該抗体を用いて GM1 によるアミロイド繊維形成開始の基礎にある分子機構を解明することを試みた。

- まず、GM1 ガングリオシド (以下、略して「GM1」とも言う)、コレステロール、及びスフィンゴミエリンを含有させた、rafts と類似する脂質組成のリポソームを
- 25 作製した。このリポソームを用い、4396C 抗体がリポソーム中の GM1 と結合した

アミロイドβタンパク質（以下、略して「Aβ」とも言う）を認識するか否かを検討したところ特異的な結合が認められた。そこで、上記リポソームの存在下におけるアミロイド繊維の形成が4396C抗体によって阻害されるか検討したところ、特異的かつ添加量依存的な阻害効果が認められた。他方、公知の他の抗Aβ抗体を用いて同様の実験を行ったところアミロイド繊維の形成の阻害はみられなかった。また、この他の抗Aβ抗体は新たに形成されたアミロイド繊維の端に結合することが示された。これらの結果は上記のシーディング仮説を支持するものであり、即ちGM1結合型Aβ（以下、略して「GM1-Aβ」ともいう）はアミロイド繊維形成における種（シード）として機能していることを示すものであった。また、公知の抗Aβ抗体とは異なり、4396C抗体はこのシードに対して特異的な結合をすることから、4396C抗体における可変領域の構造（即ち、4396抗体の可変領域の構造）、特にCDRの構造がアルツハイマー病の診断、治療等に利用できることが見出された。かかる知見から、4396C抗体の可変領域の構造、特にCDRの構造を有するヒト化抗体を作製すれば、極めて有効なアルツハイマー症の診断、治療等が可能になると考えられた。

本発明は以上の知見に基づき完成されたものであり、本発明の第1の局面は次の構成からなる。

[1] 重鎖可変領域がa)～c)の少なくとも一つの領域を有し、

GM1 ガングリオシド結合型アミロイドβタンパク質を認識し、アミロイド繊維の形成を抑制する活性を有する抗体、

a)配列番号：1に記載されるアミノ酸配列、又は該アミノ酸配列の一部を改変したアミノ酸配列からなる第1領域、

b)配列番号：2に記載されるアミノ酸配列、又は該アミノ酸配列の一部を改変したアミノ酸配列からなる第2領域、

c)配列番号：3に記載されるアミノ酸配列、又は該アミノ酸配列の一部を改変

したアミノ酸配列からなる第3領域。

[2] 軽鎖可変領域が d)～e) の少なくとも一つの領域を有し、

GM1 ガングリオシド結合型アミロイドβタンパク質を認識し、アミロイド繊維の形成を抑制する活性を有する抗体、

5 d)配列番号：4に記載されるアミノ酸配列、又は該アミノ酸配列の一部を改変したアミノ酸配列からなる第4領域、

e)配列番号：5に記載されるアミノ酸配列、又は該アミノ酸配列の一部を改変したアミノ酸配列からなる第5領域、

f)配列番号：6に記載されるアミノ酸配列、又は該アミノ酸配列の一部を改変したアミノ酸配列からなる第6領域。

[3] 重鎖可変領域が g)～i) の CDR を有し、かつ軽鎖可変領域が j)～l) の CDR を有し、

GM1 ガングリオシド結合型アミロイドβタンパク質を認識し、アミロイド繊維の形成を抑制する活性を有する抗体、

15 g)配列番号：1に記載されるアミノ酸配列、又は該アミノ酸配列の一部を改変したアミノ酸配列からなる CDR1、

h)配列番号：2に記載されるアミノ酸配列、又は該アミノ酸配列の一部を改変したアミノ酸配列からなる CDR2、

i)配列番号：3に記載されるアミノ酸配列、又は該アミノ酸配列の一部を改変したアミノ酸配列からなる CDR3、

j)配列番号：4に記載されるアミノ酸配列、又は該アミノ酸配列の一部を改変したアミノ酸配列からなる CDR1、

k)配列番号：5に記載されるアミノ酸配列、又は該アミノ酸配列の一部を改変したアミノ酸配列からなる CDR2、

25 l)配列番号：6に記載されるアミノ酸配列、又は該アミノ酸配列の一部を改変

したアミノ酸配列からなる CDR3。

[4] 重鎖可変領域が配列番号：7に記載されるアミノ酸配列、又は該アミノ酸配列の一部を改変したアミノ酸配列からなり、

5 GM1 ガングリオシド結合型アミロイドβタンパク質を認識し、アミロイド繊維の形成を抑制する活性を有する抗体。

[5] 軽鎖可変領域が配列番号：8に記載されるアミノ酸配列、又は該アミノ酸配列の一部を改変したアミノ酸配列からなり、

GM1 ガングリオシド結合型アミロイドβタンパク質を認識し、アミロイド繊維の形成を抑制する活性を有する抗体。

10 [6] 重鎖可変領域が配列番号：7に記載されるアミノ酸配列、又は該アミノ酸配列の一部を改変したアミノ酸配列からなり、

軽鎖可変領域が配列番号：8に記載されるアミノ酸配列、又は該アミノ酸配列の一部を改変したアミノ酸配列からなり、

15 GM1 ガングリオシド結合型アミロイドβタンパク質を認識し、アミロイド繊維の形成を抑制する活性を有する抗体。

[7] ヒト化抗体である、[1]～[6]のいずれかに記載の抗体。

[8] Fab、Fab'、F(ab')₂、scFv、又は dsFv 抗体である、[1]～[7]のいずれかに記載の抗体。

20 図面の簡単な説明

図1は、GM1 ガングリオシド結合型アミロイドβタンパク質を認識する抗体のH鎖可変領域の遺伝子配列及びアミノ酸配列を示す図である。CDRは相補性決定部位 (complementarity determining region) を表す。また、signal sequenceはシグナル部分の配列である。

25 図2は、GM1 ガングリオシド結合型アミロイドβタンパク質を認識する抗体の

L 鎖可変領域の遺伝子配列及びアミノ酸配列を示す図である。CDR は相補性決定部位 (complementarity determining region) を表す。また、signal sequence はシグナル部分の配列である。

図 3 は、実施例 1 における発現ベクターの構成を示した図である。図 3 (A) には、
5 H 鎖発現ベクター (BCMGSneo-H) の構成が示される。図 3 (B) には、L 鎖発現ベクター (BCMGSneo-L) の構成が示される。

図 4 は、実施例 2 における ThT アッセイの測定結果をまとめたグラフである。
図 4 A において、■は A β 溶液とリボソームとをインキュベーションした場合の
蛍光、△は A β 溶液と fA β とをインキュベーションした場合の蛍光である。リボ
10 ソームとともにインキュベーションした場合には、蛍光がラグフェーズなく直ちに増加し、双曲線的に平衡に達するのがわかる。リボソームも fA β も加えずにインキュベーションをした場合 (○) には全く蛍光は増加していない。図 4 B は、
F(∞) - F(t) 対インキュベーション時間 (0~24 時間) の方対数プロットである。
F(t) は、A β をリボソームと共にインキュベートした場合の時間の関数としての
15 蛍光の増加を表しており、F(∞) は試験的に決定した。図 4 C は、fA β を加えて
24 時間インキュベートした混液 (上段) 及びリボソームを加えて 96 時間インキュベートした混液 (下段) を電子顕微鏡撮影した結果の図である。横棒は 100nm を表す。

図 5 には実施例 3 の結果が示される。図 5 A は、染色像を電子顕微鏡撮影した
20 結果の図である。左欄は GM1 含有リボソーム (CH: コレステロール、SM: スフィンゴミエリン、GM1: GM1 ガングリオシド) と A β 溶液をインキュベーションしたサンプルを 4396C 抗体で染色した結果、中央は GM1 含有リボソームと A β 溶液をインキュベーションしたサンプルを 4G8 抗体で染色した結果、右欄は GM1 を欠くリボソーム (CH: コレステロール、SM: スフィンゴミエリン) と A β 溶液をイン
25 キュベーションしたサンプルを 4396C 抗体で染色した結果である。GM1 含有リボ

ソームは 4396C 抗体で標識されるが（左欄）、4G8 では標識されない（中央）ことがわかる。また、4396C 抗体は GM1 を欠いたリポソームを認識しないことがわかる（右欄）。横棒は 50nm を表す。図 5 B は、4396C 抗体と、GM1 又は可溶性の A β との反応性をウエスタンブロットにより検討した結果を示す図である。図 5 C は、4396C 抗体と凝集性 A β との反応性を検討した結果を示す図である。アルツハイマー病患者の脳皮質切片をホルムアルデヒド等で処理した後、4396C 抗体又は 4G8 抗体で免疫標識した結果の図である。4G8 抗体を用いた場合（右）は神経斑点が強く免疫染色されるが、4396C 抗体を用いた場合（左）は全く染色されていないことがわかる。矢印は一連の切片の脈管を示す。

図 6 A には、A β 溶液、GM1 含有リポソーム、及び 4396C 抗体を同時にインキュベーションし、アミロイド繊維形成を ThT アッセイにより調べた結果が示される。4396C 抗体分子の A β 分子に対する割合は、0.3:50 (Δ)、1.3:50 (\bigcirc)、4:50 (\square) である。また、A β に対する 4G8 抗体分子の A β 分子に対する割合は 4:50 (\diamond) である。■はいずれの抗体も加えずにインキュベーションを行った場合の結果である。図 6 B は、GM1 含有リポソームの添加に続いて、合成した A β ₁₋₄₀ と 4G8 の混合物を 24 時間同時にインキュベートして免疫電顕を行った結果を示す図である。金標識抗マウス IgG で標識化を行っている。横棒は 100nm を表す。

図 7 は、実施例 6 におけるヒト型 CDR 移植抗体可変領域 DNA の合成方法を模式的に示した図である。

発明を実施するための最良の形態

本明細書において、アミノ酸配列の一部の改変とは、アミノ酸配列を構成する 1 ～数個のアミノ酸の欠失、置換、若しくは 1 ～数個のアミノ酸の付加、挿入、又はこれらの組合せによりアミノ酸配列に変化が生ずることをいう。

本発明の第 1 の局面は、GM1 ガングリオシド (GM1) 結合型アミロイド β タン

パク質 ($A\beta$) ($GM1-A\beta$) を認識し、アミロイド繊維の形成を抑制する活性を有する抗体に関する。

本発明における抗体には、マウス、ラットなどの非ヒト動物の抗体、一部の領域を他の動物（ヒトを含む）のものに置換したキメラ抗体、ヒト化抗体、及びヒト抗体が含まれる。また、抗体のクラスも特に限定されないが、好ましくは IgG

5 クラスの抗体である。例えば、ヒト抗体のサブクラス IgG1、IgG2、IgG3、IgG4 に属する抗体である。

可変領域には、マウス抗 $GM1-A\beta$ 抗体の可変領域を用いることができる。マウス抗 $GM1-A\beta$ 抗体としては、例えばアルツハイマー病患者の脳から精製された $GM1-A\beta$ を抗原としてマウスを免疫して得られたマウス抗 $GM1-A\beta$ 抗体（例えば、

10 論文（K.Yanagisawa, J.McLaurin, M.Michikawa, A.Chakrabartty, Y.Ihara, FEBS Lett., 420, 43, (1997)）に記載される 4396 抗体）を用いることができる。

重鎖可変領域については、配列番号：1 に記載されるアミノ酸配列からなる第 1 領域、配列番号：2 に記載されるアミノ酸配列からなる第 2 領域、又は配列番号：3 に記載されるアミノ酸配列からなる第 3 領域のいずれか一つ以上の領域を含むことが好ましい。ここでの第 1 領域、第 2 領域、及び第 3 領域は、それぞれ

15 4396 抗体の重鎖 CDR1、CDR2、及び CDR3 に相当する。より好ましくは、重鎖可変領域が第 1 領域～第 3 領域の全てを含んで構成される。さらに好ましくは、重鎖可変領域が第 1 領域を CDR1、第 2 領域を CDR2、第 3 領域を CDR3 として含んで構成される。

20

軽鎖可変領域については、配列番号：4 に記載されるアミノ酸配列からなる第 4 領域、配列番号：5 に記載されるアミノ酸配列からなる第 5 領域、又は配列番号：6 に記載されるアミノ酸配列からなる第 6 領域のいずれか一つ以上の領域を含むことが好ましい。ここでの第 4 領域、第 5 領域、及び第 6 領域は、それぞれ

25 4396 抗体の軽鎖 CDR1、CDR2、及び CDR3 に相当する。より好ましくは、軽鎖可変

領域が第4領域～第6領域の全てを含んで構成される。さらに好ましくは、重鎖可変領域が第4領域をCDR1、第5領域をCDR2、第6領域をCDR3として含んで構成される。

上記第1領域～第6領域のアミノ酸配列に代えて、各アミノ酸配列の一部を改変したアミノ酸配列をそれぞれ用いることもできる。但し、アミノ酸配列の改変は、本発明の抗体がGM1-A β を認識し、アミロイド繊維の形成を抑制する活性を有する範囲に限られる。当該活性を有する限りアミノ酸配列の改変により当該活性が上昇、又は減少してもよい。改変されるアミノ酸の数は、好ましくは全体の30%以下であり、更に好ましくは全体の20%以下であり、更に更に好ましくは全体の10%以下である。

好ましい本発明の抗体の一例として、以下の構成のものを挙げることができる。重鎖可変領域が、g)配列番号：1に記載されるアミノ酸配列、又は該アミノ酸配列の一部を改変したアミノ酸配列からなるCDR1、h)配列番号：2に記載されるアミノ酸配列、又は該アミノ酸配列の一部を改変したアミノ酸配列からなるCDR2、及びi)配列番号：3に記載されるアミノ酸配列、又は該アミノ酸配列の一部を改変したアミノ酸配列からなるCDR3を有し、

軽鎖可変領域が、j)配列番号：4に記載されるアミノ酸配列、又は該アミノ酸配列の一部を改変したアミノ酸配列からなるCDR1、k)配列番号：5に記載されるアミノ酸配列、又は該アミノ酸配列の一部を改変したアミノ酸配列からなるCDR2、及びl)配列番号：6に記載されるアミノ酸配列、又は該アミノ酸配列の一部を改変したアミノ酸配列からなるCDR3を有する抗体である。当該抗体の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域のアミノ酸配列としては、それぞれ配列番号：7及び配列番号：8に記載されるものを例示することができる。この場合において、シグナル部分を除いて構成されるアミノ酸配列を用いることもできる。尚、配列番号：7及び配列番号：8のアミノ酸配列は、それぞれ4396抗体の重鎖可変領域のアミノ酸配

列及び軽鎖可変領域のアミノ酸配列に相当する。

本発明の抗体にはヒト化抗体が含まれる。ここでのヒト化抗体とは、ヒトの抗体に構造が類似した抗体のことをいい、抗体の定常領域のみをヒト抗体のものに置換したヒト型キメラ抗体、及び定常領域及び可変領域に存在する CDR（相補性決定領域）以外の部分をヒト抗体のものに置換したヒト型 CDR 移植（CDR-grafted）抗体（P.T.Johons et al., Nature 321,522(1986)）を含む。

ヒト型キメラ抗体は、例えば上記の重鎖可変領域の構造及び／又は軽鎖可変領域の構造を有する抗体（例えば、4396 抗体を遺伝子工学的クラススイッチ技術（M. Bending, S.T.Jones, in Antibody Engineering, J.McMafferty, H.R.Hoogenboom and D.J.Chiswell Eds. (IRL Press, 1996), pp.147-165) により作製した IgG クラスのマウス抗 GM1-A β 抗体（4396C 抗体））の定常領域をヒト抗体の定常領域に置換することにより作製することができる。ヒト抗体の定常領域としては公知のものを採用することができる。

以下に、ヒト型キメラ抗体の作製方法の一例を示す。

まず、マウス抗 GM1-A β 抗体を産生するハイブリドーマより mRNA を抽出し、常法に従って cDNA を合成する。合成した cDNA をベクターに組み込み cDNA ライブラリーを構築する。この cDNA ライブラリーから、H 鎖遺伝子フラグメント及び L 鎖遺伝子フラグメントをプローブとして用いることにより、H 鎖遺伝子及び L 鎖遺伝子を含有するベクターを選択する。選択されたベクターの挿入配列のシーケンシングを行うことにより、H 鎖可変領域及び L 鎖可変領域の遺伝子の配列が決定される。このようにして得られた配列データを基に H 鎖可変領域をコードする DNA を化学合成、生化学的切断／再結合等により作製する。得られた H 鎖可変領域をコードする DNA をヒト H 鎖定常領域をコードする DNA とライゲーションして発現用ベクターに組込むことにより H 鎖発現ベクターを作製する。発現ベクターとしては、例えば SV40 virus based ベクター、EB virus based ベクター、BPV（パ

ピローマウイルス) based ベクターなどを用いることができるが、これらに限定されるものではない。一方、同様の方法により L 鎖発現ベクターを作製する。これら H 鎖発現ベクター及び L 鎖発現ベクターにより宿主細胞を共形質転換する。宿主細胞としては、CHO 細胞(チャイニーズハムスター卵巣)(A.Wright & S.L.Morrison, J.Immunol.160, 3393-3402 (1998)), SP2/0 細胞(マウスミエローマ)(K.Moelans et al., Eur.J.Cancer Prev.5, 512-519 (1996), R.P.Junghans et al., Cancer Res.50, 1495-1502 (1990))などが好適に用いられる。また、形質転換にはリポフェクチン法(R.W.Malone et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA 86, 6077 (1989), P.L.Felgner et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA 84, 7413 (1987)、エレクトロポレーション法、リン酸カルシウム法(F.L.Graham & A.J.van der Eb, Virology 52, 456-467 (1973))、DEAE-Dextran 法等が好適に用いられる。

そして、この形質転換体の細胞内又は培養液よりヒト型キメラ抗体が得られる。抗体は、遠心分離、硫酸分画、塩析、限外濾過、アフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィーなどの方法を適宜組み合わせて分離、精製することができる。

一方、ヒト型 CDR 移植抗体は、例えば以下の方法により作製することができる。

まず、上記キメラ抗体の製造方法の欄で述べた方法により、マウス抗 GM1-A β 抗体の H 鎖可変領域及び L 鎖可変領域のアミノ酸配列及びそれをコードする塩基配列を決定する。併せて各 CDR 領域のアミノ酸配列及び塩基配列を決定する。

具体的な CDR の塩基配列としては、例えば、H 鎖の CDR1、CDR2、及び CDR3 に配列番号：1 1、配列番号：1 2、及び配列番号：1 3 に示されるものをそれぞれ用いることができ、L 鎖の CDR1、CDR2、及び CDR3 に配列番号：1 4、配列番号：1 5、及び配列番号：1 6 に示されるものをそれぞれ用いることができる。

次に、CDR 領域を挟んで存在する FR (フレームワーク領域) を選択する。FR の選択には、およそ三つの方法が採用できる。1 つめの方法は、NEWM、REI など既

に三次元構造の明らかとなったヒト抗体フレームを用いる方法である (Riechman
n L. et al., Nature 332, 323-327 (1988); Tempst; PR. et al., Protein Eng
ineering 7, 1501-1507 (1994); Ellis JH. et al., J. Immunol 155, 925-937
(1995))。2つめの方法は、データベースにより、目的のマウス抗体可変領域と最
5 も高いホモロジーを持つヒト抗体可変領域を選択し、その FR を用いる方法である
(Queen C. et al., Proc Natl Acad SciUSA 86, 10029-10033 (1989); Rozak M
J. et al., J Biol Chem 271, 22611-22618 (1996); Shearman CW. et al., J. I
mmunol 147, 4366-4373 (1991))。3つめの方法は、ヒト抗体の FR で最も共通に
用いられるアミノ酸を選択する方法である (Sato K. et al., Mol Immunol 31,
10 371-381 (1994); Kobinger F. et al., Protein Engineering 6, 971-980 (199
3); Kettleborough CA. et al., Protein Engineering 4, 773-783 (1991))。本
発明ではこれらいずれの方法を用いることもできる。

尚、本発明においては、選択されたヒト FR のアミノ酸配列を改変したアミノ酸
配列も、最終的に得られるヒト型 CDR 移植抗体が GM1-A β を認識し、アミロイド
15 繊維の形成を制御する活性を有する範囲において、FR のアミノ酸配列として利用
することができる。特に、選択されたヒト FR のアミノ酸の一部を CDR の由来とな
った抗体の FR のアミノ酸に変更した場合、抗体の特性が維持される可能性が高い。
改変されるアミノ酸の数は、好ましくは FR 全体の 30% 以下であり、更に好まし
くは FR 全体の 20% 以下であり、更に更に好ましくは FR 全体の 10% 以下であ
20 る。

次に、これらいずれかの方法により選択した FR と上記 CDR とを組み合わせること
により、H 鎖可変領域及び L 鎖可変領域をコードする DNA を設計する。この設
計を基に H 鎖可変領域をコードする DNA と L 鎖可変領域をコードする DNA を化学
合成、生化学的切断／再結合等によりそれぞれ作製する。そして、H 鎖可変領域
25 をコードする DNA をヒト免疫グロブリン H 鎖定常領域をコードする DNA とともに

発現ベクターに組み込み H 鎖発現ベクターを構築する。同様に、L 鎖可変領域をコードする DNA をヒト免疫グロブリン L 鎖定常領域をコードする DNA とともに発現ベクターに組み込み L 鎖発現ベクターを構築する。発現ベクターとしては、例えば SV40 virus based ベクター、EB virus based ベクター、BPV (パピローマウイルス) based ベクターなどを用いることができるが、これらに限定されるものではない。

10 以上の方法で作製された H 鎖発現ベクター及び L 鎖発現ベクターにより宿主細胞を共形質転換する。宿主細胞としては、CHO 細胞(チャイニーズハムスター卵巣)(A.Wright & S.L.Morrison, J.Immunol.160, 3393-3402 (1998))、SP2/0 細胞(マウスミエローマ)(K.Motmans et al., Eur.J.Cancer Prev.5, 512-519 (1996), R.P. Junghans et al., Cancer Res. 50, 1495-1502 (1990))などが好適に用いられる。また、形質転換にはリポフェクチン法(R.W.Malone et al., Proc.Natl.Acad.Sci.US A 86, 6077 (1989), P.L.Felgner et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA 84, 7413 (1987)、エレクトロポレーション法、リン酸カルシウム法(F.L.Graham & A.J.van der Eb, Virology 52, 456-467(1973))、DEAE-Dextran 法等が好適に用いられる。そして、この形質転換体の細胞内又は培養液よりヒト型 CDR 移植抗体が得られる。抗体は、遠心分離、硫酸分画、塩析、限外濾過、アフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィーなどの方法を適宜組み合わせて分離、精製することができる。

20 本発明の抗体を基に、又は当該抗体をコードする遺伝子の配列情報を基に抗体断片を作製することができる。抗体断片としては、Fab、Fab'、F(ab')₂、scFv、dsFv 抗体が挙げられる。

Fab は、IgG をシステイン存在下パパイニン消化することにより得られる、L 鎖と H 鎖可変領域、並びに C_H1 ドメイン及びヒンジ部の一部からなる H 鎖フラグメントとから構成される分子量約 5 万の断片である。本発明では、上記抗体をパパイ

25

ン消化することにより得ることができる。また、上記抗体の H 鎖の一部及び L 鎖をコードする DNA を適当なベクターに組み込み、当該ベクターを用いて形質転換した形質転換体より Fab を調製することもできる。

5 Fab' は、後述の $F(ab')_2$ の H 鎖間のジスルフィド結合を切断することにより得られる分子量が約 5 万の断片である。本発明では、上記抗体をペプシン消化し、還元剤を用いてジスルフィド結合を切断することにより得られる。また、Fab 同様に、Fab' をコードする DNA を用いて遺伝子工学的に調製することもできる。

10 $F(ab')_2$ は、IgG をペプシン消化することにより得られる、L 鎖と H 鎖可変領域、並びに C_H1 ドメイン及びヒンジ部の一部からなる H 鎖フラグメントとから構成される断片 (Fab') がジスルフィド結合で結合した分子量約 10 万の断片である。本発明では、上記抗体をペプシン消化することにより得られる。また、Fab 同様に、 $F(ab')_2$ をコードする DNA を用いて遺伝子工学的に調製することもできる。

scFv は、H 鎖可変領域と L 鎖可変領域とからなる Fv を、片方の鎖の C 末端と他方の N 末端とを適当なペプチドリンカーで連結し一本鎖化した抗体断片である。
15 ペプチドリンカーとしては、例えば柔軟性の高い (GGGGS)₃ などを用いることができる。例えば、上記抗体の H 鎖可変領域及び L 鎖可変領域をコードする DNA とペプチドリンカーをコードする DNA を用いて scFv 抗体をコードする DNA を構築し、これを適当なベクターに組み込み、当該ベクターを用いて形質転換した形質転換体より scFv を調製することができる。

20 dsFv は、H 鎖可変領域及び L 鎖可変領域の適切な位置に Cys 残基を導入し、H 鎖可変領域と L 鎖可変領域とをジスルフィド結合により安定化させた Fv 断片である。各鎖における Cys 残基の導入位置は分子モデリングにより予測される立体構造に基づき決定することができる。本発明では、例えば上記抗体の H 鎖可変領域及び L 鎖可変領域のアミノ酸配列から立体構造を予測し、かかる予測に基づき変異を導入した H 鎖可変領域及び L 鎖可変領域をそれぞれコードする DNA を構築し、
25

これを適当なベクターに組み込み、そして当該ベクターを用いて形質転換した形質転換体より dsFv を調製することができる。

尚、適当なリンカーを用いて scFv 抗体、dcFv 抗体などを連結させたり、ストレプトアビジンを融合させたりして抗体断片を多量体化することもできる。

- 5 本発明の抗体（抗体断片を含む）に低分子化合物、タンパク質、標識物質などを融合又は結合させることにより、融合抗体又は標識化抗体を構成することができる。標識物質としては、 ^{125}I 等の放射性物質、ペルオキシダーゼ、 β -D-ガラクトシダーゼ、マイクロペルオキシダーゼ、ホースラディッシュペルオキシダーゼ (HRP)、フルオレセインイソチオシアネート (FITC)、ローダミンイソチオシアネート (RITC)、アルカリホスファターゼ、ビオチンなどを用いることができる。
- 10 アネート (RITC)、アルカリホスファターゼ、ビオチンなどを用いることができる。

本発明の第 2 の局面は、本発明の第 1 の局面の抗体をコードする DNA に関する。即ち、本発明の第 2 の局面は、GM1-A β を認識し、アミロイド繊維の形成を抑制する活性を有する抗体の DNA に関し、特に、当該活性を有するヒト型キメラ抗体、ヒト型 CDR 移植抗体をコードする DNA、及び抗体断片をコードする DNA を含む。

- 15 また、これらの抗体又は抗体断片の H 鎖又は L 鎖をコードする DNA も本発明の一つである。更に、これらの抗体又は抗体断片の H 鎖可変領域又は L 鎖可変領域をコードする DNA も本発明の一つである。この場合において、シグナル部分を除いて構成される DNA であってもよい。具体的な H 鎖可変領域の DNA 配列としては配列番号：9 に示すものが挙げられる。また L 鎖可変領域の DNA 配列としては配列
- 20 番号：10 に示すものが挙げられる。

更には、GM1-A β を認識し、アミロイド繊維の形成を抑制する活性を有する抗体の可変領域 CDR をコードする遺伝子の配列も本発明の一つである。具体的には、配列番号：1 に記載されるアミノ酸配列をコードする配列（例えば、配列番号：11 に記載される配列）、配列番号：2 に記載されるアミノ酸配列をコードする配列（例えば、配列番号：12 に記載される配列）、配列番号：3 に記載されるアミ

25 列（例えば、配列番号：12 に記載される配列）、配列番号：3 に記載されるアミ

ノ酸配列をコードする配列（例えば、配列番号：13に記載される配列）、配列番号：4に記載されるアミノ酸配列をコードする配列（例えば、配列番号：14に記載される配列）、配列番号：5に記載されるアミノ酸配列をコードする配列（例えば、配列番号：15に記載される配列）、又は配列番号：6に記載されるアミノ酸配列をコードする配列（例えば、配列番号：16に記載される配列）からなる DNA である。以上の DNA は、化学合成、生化学的切断／再結合などにより作製でき、GM1-A β を認識し、アミロイド繊維の形成を抑制する活性を有する抗体、抗体断片の作製等に利用することができる。

本発明の DNA をベクターに組み込み、これを用いて宿主細胞を形質転換することができる。また、本発明の DNA の中で抗体重鎖（又は重鎖可変領域）をコードする DNA を一のベクターに組み込み、他方、抗体軽鎖（又は軽鎖可変領域）をコードする DNA を他のベクターに組み込み、得られた二つの発現ベクターで宿主細胞を共形質転換させることもできる。さらには、本発明の DNA の中で抗体重鎖（又は重鎖可変領域）をコードする DNA 及び抗体軽鎖（又は軽鎖可変領域）をコードする DNA を一のベクターに組み込み、これを用いて宿主細胞を形質転換することもできる。

用いられるベクターの種類は、本発明の DNA を発現可能に組込むことができ、かつ宿主細胞で発現できるものであれば特に限定されない。

宿主細胞としては、使用するベクターにより形質転換されて本発明の DNA を発現できるものであればその種類を問わない。例えば、エッシュリヒア・コリ（*Escherichia coli*）等の細菌、サッカロミセス・セレビシエ（*Saccharomyces cerevisiae*）等の酵母、COS 細胞、CHO 細胞等の動物細胞を用いることができる。

形質転換体を培養することにより、形質転換体の細胞内又は培養液中に GM1-A β を認識し、アミロイド繊維の形成を抑制する活性を有する抗体又は抗体断片を産生（発現）させることができる。そして産生された抗体（抗体断片を含む）を

回収することにより、本発明の第1の局面である抗体を得ることができる。得られた抗体は、遠心分離、硫酸分画、塩析、限外濾過、アフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィーなどの方法を適宜組み合わせて分離、精製することができる。

- 5 本発明の抗体が、GM1-A β を認識する活性を有するか否かは、被験対象を GM1-A β に接触させ両者の結合性をみることにより確認できる。例えば、GM1 ガングリオシド (GM1) 結合型アミロイド β タンパク質 (A β) (GM1-A β) を含む脂質膜を構成し、これと被験対象との結合性をみる。また、GM1 を含む脂質膜を用意しておき、これに A β を含む溶液及び被験対象抗体を同時に接触 (添加) することにより、被験対象の GM1-A β 結合能を調べることもできる。 GM1-A β を含む脂質膜は、例えば、GM1 を含む脂質膜に A β を含む溶液を接触 (添加) することにより調製することができる。この場合、GM1 を含む脂質膜と A β を含む溶液との接触は短時間行われることが好ましく、更に好ましくは両者を瞬間的に接触させる。
- 10

- GM1 を含む脂質膜としては、GM1 と脂質を成分として含有するものであれば特にその構成は限定されないが、脂質成分としてスフィンゴミエリンを含む脂質膜が好適に用いられる。また、コレステロールをさらに含む脂質膜が好適に用いられる。かかる脂質膜の構成はアミロイド繊維が形成される脳内の神経細胞膜のそれに近く、当該構成の脂質膜を用いることにより生体においてアミロイド繊維の形成を有効に抑制し得る抗体であることの確認が行えることとなる。
- 15

- GM1 としては、例えば市販のもの (和光純薬工業株式会社、大阪、日本が提供するもの等) を使用することができる。A β としては、例えば、市販の A β ₁₋₄₀ (Lot. 501001、ペプチド研究所、大阪、日本、Lot. 519599、Bachem AG、スイスなど) などを使用することができる。
- 20

- GM1 を含む脂質膜はリポソーム状に調製し得る。また、ポリスチレン樹脂、ポリカーボネート樹脂、シリコン樹脂、ナイロン樹脂等の樹脂やガラス等からなる
- 25

ビーズ、マイクロプレート等の不溶性支持体に脂質膜を結合させて使用することもできる。

尚、 $A\beta$ の存在下で被験対象と GM1- $A\beta$ の接触を行いアミロイド繊維の形成が抑制されれば、被験対象の抗体が GM1- $A\beta$ に結合し、かつアミロイド繊維の形成を

5 抑制する活性を有することを確認できる。

GM1- $A\beta$ を含む脂質膜は GM1- $A\beta$ に結合性を有する化合物のスクリーニングにも利用できる。即ち、以下の工程を含むことにより、GM1- $A\beta$ に結合性を有する化合物のスクリーニング方法を構成できる。

1) GM1 ガングリオシド結合型アミロイド β タンパク質を含む脂質膜に試料を接
10 触させる工程、及び 2) 前記脂質膜に結合した化合物を回収する工程である。

工程 1) において GM1 ガングリオシド結合型アミロイド β タンパク質 (GM1- $A\beta$) を含む脂質膜は、リポソーム状又は不溶性支持体 (例えばマイクロプレート) に結合された状態で使用される。リポソーム状の脂質膜を用いる場合には、工程
15 2) において GM1- $A\beta$ に結合した化合物を遠心法で分離し、精製することにより目的の化合物を得ることができる。また、候補化合物が抗体の場合には、calcein を内包させた GM1- $A\beta$ 含有のリポソームを工程 1) の脂質膜として用い、そして補体の作用を利用することにより、リポソームが破壊されて放出される calcein 量を測定して候補化合物の GM1- $A\beta$ 結合活性を測定することができる。一方、不溶性支持体に結合された状態の脂質膜を用いる場合において候補化合物が抗体の
20 きには、EIA、ELISA 等により候補化合物の GM1- $A\beta$ 結合活性を測定することができる。

上記の工程 1) に代えて、以下の工程 1-1) 及び 1-2) を行うこともできる。

1-1) GM1 ガングリオシドを含む脂質膜とアミロイド β タンパク質とを接触させ、GM1 ガングリオシド結合型アミロイド β タンパク質を形成する工程、1-2) 前記脂
25 質膜に試料を接触させる工程である。

工程 1-1)における GM1 ガングリオシド (GM1) を含む脂質膜とアミロイド β タンパク質 ($A\beta$) との接触は、例えば当該脂質膜を分散させた溶液中に $A\beta$ を含む溶液を添加することにより行われる。また、固相に固定化した脂質膜 (例えば、マイクロプレートに結合した脂質膜) を用い、当該脂質膜に $A\beta$ を含む溶液を接

5 触させることによっても行うことができる。

上記の工程 1-1) 及び 1-2) を実質的に同時に行うこともできる。即ち、以下の工程を含むことにより、GM1- $A\beta$ に結合性を有する化合物のスクリーニング方法を構成できる。

1') GM1 ガングリオシドを含む脂質膜を含む溶液にアミロイド β タンパク質と

10 試料とを添加する工程である。

以上の工程に加えて、アミロイド繊維の形成が抑制されることを確認する工程 (工程 3)) を行うことにより、スクリーニング方法により選択される化合物が GM1- $A\beta$ に結合性を有し、かつアミロイド繊維の形成を抑制する活性を有することを確認することが可能となる。例えば、回収された GM1- $A\beta$ 結合活性を有する化

15 合物を、アミロイド繊維が形成される環境下に共存させ、アミロイド繊維形成に対する影響、効果を確認する。また、工程 1) 又は工程 1-2) を行う際、試料とともに $A\beta$ を添加し、そしてアミロイド繊維の形成を観察することによっても当該工程 3) を行うことができる。

以上のスクリーニング方法により選択された化合物は GM1- $A\beta$ に結合性を有す

20 る。従って、GM1- $A\beta$ に $A\beta$ が重合してアミロイド繊維が形成されることを抑制しないし防止することに利用できる。

スクリーニング対象の試料としては、天然又は合成のタンパク質、ペプチド、抗体 (本発明の抗体を含む)、細胞抽出液、培養上清などを用いることができる。

本発明の第 1 の局面における抗体 (抗体断片を含む) を利用して GM1- $A\beta$ に結

25 合する活性を有する化合物のスクリーニング方法を構成することができる。即ち、

本発明は、以下の工程を含む、GM1-A β に結合する活性を有する化合物のスクリーニング方法も提供する。

i) 本発明の第 1 の局面における抗体又は抗体断片に結合する第 1 の化合物を選択する工程、及び ii) 前記第 1 の化合物に結合する第 2 の化合物を選択する工程
5 である。このスクリーニング方法においても、アミロイド繊維の形成が抑制されることを確認する工程を含ませることにより、スクリーニング方法により選択される化合物が GM1-A β に結合性を有し、かつアミロイド繊維の形成を抑制する活性を有することを確認することが可能となる。

工程 i) では、抗体又は抗体断片と試料との結合性が調べられ、結合性を有する
10 第 1 の化合物が選択される。ここでの試料には、上述の場合と同様に、天然又は合成のタンパク質、ペプチド、抗体（本発明の抗体を含む）、細胞抽出液、培養上清などを用いることができる。

工程 i) において、使用される抗体を固相に固定化しておき、これに試料を接触
15 させることができる。これとは逆に、試料側を固相に固定化しておくこともできる。

使用する抗体を予め標識化しておくことにより選択（検出）の容易化、選択（検出）効率の向上を図ることもできる。標識化には、¹²⁵I 等の放射性物質、ペルオキシダーゼ、 β -D-ガラクトシダーゼ等の酵素等を用いることができる。また、使用する抗体を認識する二次抗体を用いて選択（検出）効率の向上を図ることも
20 できる。

本発明の第 1 の局面における抗体（抗体断片を含む）を、GM1-A β を認識する抗体に結合する化合物のスクリーニング方法に利用することもできる。即ち、以下の工程 A) 及び B) を含む、GM1-A β を認識する抗体に結合する化合物のスクリーニング方法を構成することができる。

25 A) 本発明の抗体に試料を接触させる工程、及び

B) 前記抗体に結合した化合物を回収する工程。

ここでの試料としては、天然又は合成のタンパク質、ペプチド、細胞抽出液、培養上清などが用いられる。

また、以下の工程を含む、GM1-A β を認識する抗体に結合する化合物のスクリーニング方法を構成することもできる。

C) 本発明の抗体の可変領域の立体構造を予測する工程、

D) 前記立体構造に相補的な立体構造を有する化合物を選択する工程。

抗体可変領域の立体構造は、NMR（核磁気共鳴）法（Wuthrich, K. : NMR of Protein and Nucleic Acids, John Wiley & Sons, New York, 1986）、X線結晶構造解析（Blundell, T.L. and John, L.N. : Protein Crystallography, Academic Press, Oxford, pp.1-565, 1976、McPherson, A. : Preparation and Analysis of Protein Crystals, John Wiley & Sons, New York, pp.1-371, 1982、松島正明ら：蛋白工学研究法, 第7章, 立体構造解析, 廣川書店, 東京, 160-200, 1990）等の方法により予測することができる。

15 工程 D) における候補化合物としては、植物、動物、細菌などから抽出した天然タンパク質、天然ペプチド、天然高分子化合物等の他、合成タンパク質、合成ペプチド、合成高分子化合物、合成低分子化合物等を例示できる。

以上のスクリーニング方法で取得される化合物は抗 GM1-A β 抗体に結合する活性を有することから、生体に投与されれば抗 GM1-A β 抗体の産生を惹起することができると考えられる。即ち、生体の備える免疫防御機構に作用して抗 GM1-A β 抗体を産生させることができ、その結果、この抗体の作用により生体において形成された GM1-A β に A β が重合してアミロイド繊維が形成されることを抑制することができると考えられる。従って、当該化合物を用いてアルツハイマー病を予防、又は治療することが可能と考えられる。換言すれば、当該化合物を用いることによりアルツハイマー病の予防方法、及び治療方法が提供される。また、当該

化合物を有効成分として含有するアルツハイマー病に対する薬剤、即ちワクチン又は治療薬を構成できる。一方、上記のスクリーニング方法等で用いられる GM1-A β を含む脂質膜についても抗 GM1-A β 抗体に認識されるため、これを生体に投与することにより抗 GM1-A β 抗体の産生を惹起する作用を奏することができるものと考えられる。従って、当該脂質膜も同様の目的に使用することが可能といえる。

製剤化する場合には、製剤上許容される他の成分（例えば、生理食塩水、賦形剤、防腐剤、）を含有させることができる。また、種々の形態に製剤化できる。例えば、カプセル剤、シロップ剤、錠剤、顆粒剤などとして調製でき、経口投与、
10 非経口投与（静脈内、動脈内、皮下、筋肉、腹腔内注射など）により適用することができる。

投与量については、症状、患者の年齢、体重などによって異なるが、当業者であれば適宜適当な投与量を選択、設定することが可能である。

一方、本発明の抗体（抗体断片を含む）は、GM1-A β と特異的に結合し、アミ
15 ロイド繊維の形成を抑制することができるため、アルツハイマー病の診断、予防、治療等に有用である。即ち、本発明の抗体を用いてアルツハイマー病の診断、予防、又は治療を行うことができると考えられる。換言すれば、本発明の抗体を用いることによりアルツハイマー病の診断方法、予防方法、及び治療方法が提供される。また、本発明の抗体を用いてアルツハイマー病に対する薬剤（診断薬、
20 予防薬、又は治療薬）を構成できる。ここで、ヒト化した本発明の抗体を用いれば、ヒトに投与した場合であってもヒトタンパク質と認識されるため循環器系から排除されにくく、またアレルギー反応もおこり難いので、好適な診断薬等として用いることができると考えられる。一方、上記のスクリーニング方法で選択される GM1-A β に結合性を有する化合物もアルツハイマー病の診断方法、予防方法、治療
25 方法に用いることができる。また、当該化合物を用いてアルツハイマー病に対す

る薬剤（診断薬、予防薬、又は治療薬）を構成することもできる。

本発明の薬剤には、製剤上許容される他の成分（例えば、生理食塩水、賦形剤、防腐剤、）を含有させることができる。また、種々の形態に製剤化できる。例えば、カプセル剤、シロップ剤、錠剤、顆粒剤などとして調製でき、経口投与、非経口
5 投与（静脈内、動脈内、皮下、筋肉、腹腔内注射など）により適用することができる。尚、本発明の抗体を複数組み合わせることで薬剤を構成してもよい。

投与量については、症状、患者の年齢、体重などによって異なるが、当業者であれば適宜適当な投与量を選択、設定することが可能である。

10 [実施例 1] IgG 型抗体の作製

1-1) 可変領域の遺伝子配列の決定

先の論文（K.Yanagisawa, J.McLaurin, M.Michikawa, A.Chakrabartty, Y.Ihara, FEBS Lett., 420, 43 (1997)）に記載される抗体（4396 抗体）を産生するハイブリドーマ（以下、「A β 1-42C」という）の可変領域の遺伝子配列を以下の手
15 順で決定した。尚、A β 1-42C は、脳から精製した GM1-A β を免疫源として作製されたハイブリドーマであり、4396 抗体は GM1-A β を特異的に認識する IgM クラスの抗体である。

まず、「ZAPcDNA キット」（ストラタジーン社）を用いて A β 1-42C の cDNA ライブラリーを作製した。作製方法はキット中のプロトコールに従った。A β 1-42C を
20 DMEM/10%FCS で培養し、約 3×10^7 個の細胞よりポリ A⁺RNA を調製した。そのポリ A⁺RNA 5 μ g より第 1 鎖 cDNA を合成した後、第 2 鎖 cDNA を合成し、次にリンカー（EcoRI、XhoI サイトをもつ）をライゲーションし、その cDNA をキット中の「Uni-ZAP XR ベクター」の EcoRI/XhoI サイトに組み込んだ。次に「ZAPcDNA Gigapack III Gold Cloning Kit」（ストラタジーン社）を用いてベクターを VCMG13 フェージにパッケージングした。
25

そのファージを「ZAPcDNA Gigapack III Gold Cloning Kit」中の大腸菌/XL-I blue に感染させ、培地上でプラークを形成させた後、以下のようにしてプラークハイブリダイゼーションを行った。プローブは、予め PCR で増殖させた μ 鎖遺伝子 (H 鎖定常領域) フラグメントと λ 鎖遺伝子 (L 鎖定常領域) フラグメントを用いた。

5 プラークを形成させた NZY 培地上に「Hybond-N+メンブレン」(アマシャム社) をのせ、プラークをメンブレンに転写させた後、メンブレンを 1.5M NaCl/0.5M NaOH で 2 分、次に 1.5M NaCl/0.5M Tris-HCl (pH7.5) で 5 分、0.2M Tris-HCl (pH7.5) /2 \times SSC で 30 秒処理し風乾させ「ECL direct nucleic acid labeling and detection systems」(アマシャム社) を用いて DNA プローブをラベルし、そのラベルプローブとメンブレンを 42 $^{\circ}$ C、4 時間インキュベートした後、洗浄し、発色基質に浸した。次にそのメンブレンを「Hyper-film ECL」(アマシャム社) に密着させ 5 分感光した。そのフィルムをもとに培地よりポジティブプラークを単離した。ポジティブファージを選択した後、「Uni-ZAP XR ベクタークローニングキット」(ストラタジーン社) を用いて、ポジティブファージを該キットに添付の大腸菌/SOLR 株に感染させ、ファージ中の「Uni-ZAP XR DNA」から、ファージミドを切り出させた。その大腸菌/SOLR 株からファージミド DNA をアルカリ SDS 法により精製した。そして、これらファージミド DNA 中のインサートの配列をジデオキシ法により決定した。

20 その結果、これらの DNA は、それぞれ μ 鎖遺伝子 (H 鎖定常領域) と λ 鎖遺伝子 (L 鎖定常領域) を含んでいた。そして、各 DNA より H 鎖可変領域 (V_H) 及び L 鎖可変領域 (V_L) の遺伝子配列及びアミノ酸配列が図 1 及び図 2 に示されるように決定された。図 1 及び図 2 において、CDR は相補性決定部位 (complementarity determining region) を表す。尚、H 鎖可変領域のアミノ酸配列を配列番号 :
25 7 (1 位から 19 位までの配列はシグナル配列をコードする) に、該配列をコー

ドする塩基配列を配列番号：9（1位から57位までの配列はシグナル配列をコードする）に、L鎖可変領域のアミノ酸配列を配列番号：8（1位から19位までの配列はシグナル配列をコードする）に、該配列をコードする塩基配列を配列番号：10（1位から57位までの配列はシグナル配列をコードする）に示す。

- 5 また、H鎖可変領域のCDR1のアミノ酸配列を配列番号：1に、該配列をコードする塩基配列を配列番号：11に、CDR2のアミノ酸配列を配列番号：2に、該配列をコードする塩基配列を配列番号：12に、CDR3のアミノ酸配列を配列番号：3に、該配列をコードする塩基配列を配列番号：13に示す。同様に、L鎖可変領域のCDR1のアミノ酸配列を配列番号：4に、該配列をコードする塩基配列を配列番号：14に、CDR2のアミノ酸配列を配列番号：5に、該配列をコードする塩基配列を配列番号：15に、CDR3のアミノ酸配列を配列番号：6に、該配列をコードする塩基配列を配列番号：16に示す
- 10

1-2) H鎖発現ベクター及びL鎖発現ベクターの作製

- 4396抗体由来の上記H鎖可変領域DNAをマウスIgG2a抗体H鎖定常領域DNAと
15 ライゲーションし、発現ベクター「BCMGS Neoベクター」（鳥山一「ウシパピロー
マウウイルスベクター」, 村松正実および岡山博人編, 実験医学別冊 遺伝子工学ハン
ドブック, 羊土社, pp.297-299 (1991)) (XhoI 及び NotI で切断) に組み込み H 鎖
発現ベクター (BCMGSneo-H) を構築した (図3 (A))。同様に、4396抗体由来の
上記L鎖可変領域DNAをマウスIgG2a抗体L鎖定常領域DNAとライゲーションし、
20 発現ベクター「BCMGS Neoベクター」(XhoI 及び NotI で切断) に組み込み L 鎖発
現ベクター (BCMGSneo-L) を構築した (図3 (B))。

1-3) トランスフェクション

- H鎖発現ベクター及びL鎖発現ベクターをCHO（チャイニーズハムスター卵巣）
細胞にリポフェクション法を用いて同時にトランスフェクションし、37℃で12時間
25 培養した後96穴プレートに移植し、G-418 500 μ g/ml を含むDMEM/10%FCSで選

択した。

培養液中の IgG 量は以下のようにして測定した。抗マウス γ 鎖（株式会社医学生物学研究所：code 303G）を $10 \mu\text{g/ml}$ に PBS で希釈調製し、ポリスチレン製マイクロプレートに $100 \mu\text{l}$ /ウェルずつ分注し、 4°C で一晩感作させた。次に、5% BSA/5% ショ糖/PBS を用いて 4°C で一晩ブロッキングした。100 μl のサンプルを 37°C で 1 時間反応させた後、PBS/0.05% Tween20 で洗浄した。洗浄後、4000 倍希釈したペルオキシダーゼ標識抗マウス IgG（株式会社医学生物学研究所：code 330）を 37°C で 1 時間反応させ、PBS/0.05% Tween20 で洗浄後、酵素基質液を $100 \mu\text{l}$ 分注して室温で 15 分反応させた。そして、各ウェルに 2N 硫酸を $100 \mu\text{l}$ ずつ分注し、 A_{492} を測定した。コントロールには、マウス血清（IgG 量： 200ng/ml 、 20ng/ml 、 2ng/ml 、 0.2ng/ml ）を用いた。このようにして、最も発現量の多いクローンを選択し、その培養上清を回収した。回収された培養上清より、protein A アガロースカラムを用いて抗体を精製した。その結果得られた抗体を 4396C 抗体とした。

15 [実施例 2] 4396C 抗体の GM1-A β に対する結合性の検討

GM1 によるアミロイド繊維形成開始の分子機構を解明するために、GM1 を含有するリポソームを用いて動力学的及び形態学的解析を行った。

2-1) A β 溶液の調製

合成 A β_{1-40} （Lot. 501001、ペプチド研究所、大阪、日本）を最初に 0.002% のアンモニア溶液に約 $500 \mu\text{M}$ となるように溶解し、100,000rpm で 3 時間遠心した（TLA120.0 ローター、Optima TL、ベックマン、カルフォルニア州、米国）。上清の上 3 分の 2 を集め、A β の濃度を決定した。A β 溶液は小分けして使用時まで -80°C に保存した。使用直前に溶解し、生理的トリス緩衝液（TBS： 150mM NaCl 及び 10mM Tris-HCl, pH7.4）で適切な濃度に希釈した。

25 2-2) GM1 含有リポソームの調製

コレステロールとスフィンゴミエリン（シグマ-アルドリッチ、セントルイス、ミズーリー州、米国）及び GM1（和光純薬工業株式会社、大阪、日本）をクロロホルム／メタノール混液（1:1）に 2:2:1 の割合で 1 モル濃度に溶解した。この混液を窒素ガスで 1 時間乾燥し、 -40°C で使用時まで保存した。使用直前に乾燥した脂質混合物を GM1 濃度が 2.5mM になるように TBS に再懸濁し、液体窒素を用いて 10 回凍結溶解を行った。この脂質懸濁液を $13,000\text{rpm}$ で 15 分間遠心し（MX-160、TOMY、東京、日本）、沈渣を再度 GM1 が同濃度になるよう TBS に再懸濁した。最後にこの懸濁液を氷上で 5 分間マイクロチップ（TP-030、TOMY、東京、日本）を備えた超音波破碎機（UD-201、出力レベル 2、TOMY、東京、日本）を用いて超音波処理し、これを 3 回繰り返した。

2-3) 線維形成の核としての繊維状 $A\beta$ (f $A\beta$) の調製

合成された $A\beta_{1-40}$ （Bachem AG, スイス、Lot. 519599）を 4°C で約 $500\mu\text{M}$ のアンモニア溶液に短時間ボルテックスすることにより溶解し、インキュベーションバッファー（ 50mM リン酸緩衝液、 $\text{pH}7.5$; 100mM NaCl）で $50\mu\text{M}$ に希釈した。 37°C で 24 時間インキュベートした後、混合液を $1.6 \times 10^4\text{g}$ 、 4°C で 3 時間遠心した。エッペンドルフチューブ内で、沈渣を $0.005\%\text{NaN}_3$ を含む氷冷したインキュベーションバッファーに再懸濁し、マイクロチップ（TP-030、TOMY、東京、日本）を備えた超音波破碎機（UD-201、TOMY、東京、日本）を用いて氷上で超音波処理し、使用時まで 4°C で保存した。

2-4) ThT（チオフラビン T）アッセイ

分光蛍光光度計（RF-5300PC、株式会社島津製作所、京都、日本）を用い、文献（H. Naiki, F. Gejyo, Methods Enzymol. 309, 305 (1999)）に記載される方法に従って ThT アッセイを行った。まず、2-1) で調製された $A\beta$ 溶液と、2-2) で調製された $A\beta$ 濃度 $50\mu\text{M}$ のリボソーム（GM1 : $A\beta$ = 10 : 1）又は 2-3) で調製された $10\mu\text{g/ml}$ の f $A\beta$ を PCR チューブ（ELT-0.5 Ryocou）中に入れ、Dr

y Thermo Unit Incubator (DTU-1B、タイテック、越谷、日本) を用いて 37℃でインキュベートした。測定直前に各チューブから 5 μ l のインキュベーション混液を取り、5 μ M の ThT を含む 50mM グリシン-NaOH バッファー (pH8.5) 995 μ l に混合した後、アミロイド繊維の至適蛍光 (励起波長 450nm、蛍光波長 490nm) を測定した。測定結果をグラフにまとめたものを図 4 に示す。図 4 A において、■は A β 溶液とリボソームとをインキュベーションした場合の蛍光、△は A β 溶液と fA β とをインキュベーションした場合の蛍光である。リボソームとともにインキュベーションした場合には、蛍光がラグフェーズなく直ちに増加し、双曲線的に平衡に達するのがわかる。

- 10 尚、リボソームも fA β も加えずにインキュベーションをした場合 (○) には全く蛍光は増加していない。図 4 B は、 $F(\infty) - F(t)$ 対インキュベーション時間 (0 ~ 24 時間) の方対数プロットである。 $F(t)$ は、A β をリボソームと共にインキュベートした場合の時間の関数としての蛍光の増加を表しており、 $F(\infty)$ は試験的に決定した。直線回帰と相関係数を計算した ($r=0.997$)。 $F(t)$ が $F'(t) = B - CF(t)$ の
- 15 式で表されること、即ち、一次回帰モデル (参考文献 18 参照) に従うことがわかる。このように、リボソームの存在下における繊維形成が一次回帰モデルで進行することが示された。

- 図 4 C は、fA β を加えて 24 時間インキュベートした混液 (上段) 及びリボソームを加えて 96 時間インキュベートした混液 (下段) を電子顕微鏡撮影した結果である。これらの結果から、リボソームの存在下において典型的なアミロイド繊維が形成されることがわかる。尚、図 4 C において横棒は 100nm を表す。
- 20

- 以上の結果より、まず可溶性の A β が膜状ですばやく GM1 に結合し、これにより GM1-A β 複合体 (GM1-A β) の形成がなされ、続いて GM1-A β が heretologous な seed となり、これに可溶性 A β が結合すること、及び連続的に伸長する繊維の
- 25 末端に可溶性 A β が結合することによりアミロイド繊維の形成が進むことが強く

示唆された。

〔実施例 3〕 4396C 抗体のアミロイド繊維形成阻害能の検証

3-1) 4396C 抗体の結合能の検討

実施例 1 で調製した 4396C 抗体がリポソーム中において GM1 と結合した A β (GM1-A β) を特異的に認識するか否かを検討した。まず、実施例 2 で調製した GM1 含有リポソーム又は GM1 を欠いたリポソーム (比較対照) を実施例 2 で調製した A β 溶液とインキュベーションした。インキュベーション混液は、炭素コートした formvarnickel grid に載せるまで氷上で保存した。1%ウシ血清アルブミンで 12 $^{\circ}$ C、5 分間インキュベートすることにより非特異結合をブロッキングした。次に、各 grid を 4396C 抗体又は 4G8 抗体 (A β を認識する公知の抗体: K.S. Kim, et al., *Neurosci. Res. Commun.* 2, 121 (1988)) で終濃度 20 μ g/ml、12 $^{\circ}$ C、45 分間の条件において処理した。その後、20 分の 1 に希釈した 5nm の金標識抗マウス IgG (British BioCell International Ltd.) で 12 $^{\circ}$ C、60 分間処理した。そして、2%の酢酸ウラニウムでネガティブ染色を行った。

図 5 A は、染色像を電子顕微鏡撮影した結果である。左欄は GM1 含有リポソーム (CH: コレステロール、SM: スフィンゴミエリン、GM1: GM1 ガングリオシド) と A β 溶液をインキュベーションしたサンプルを 4396C 抗体で染色した結果、中央は GM1 含有リポソームと A β 溶液をインキュベーションしたサンプルを 4G8 抗体で染色した結果、右欄は GM1 を欠くリポソーム (CH: コレステロール、SM: スフィンゴミエリン) と A β 溶液をインキュベーションしたサンプルを 4396C 抗体で染色した結果である。GM1 含有リポソームは 4396C 抗体で標識されるが (左欄)、4G8 では標識されない (中央) ことがわかる。また、4396C 抗体は GM1 を欠いたリポソームを認識しないことがわかる (右欄)。尚、横棒は 50nm を表す。以上の結果より、4396C 抗体はリポソーム中に形成された GM1-A β を特異的に認識することが示された。また、良く知られた抗 A β 抗体の一つである 4G8 抗体は GM1-A β

を認識できないことが示された。

次に、4396C 抗体と、GM1 又は可溶性の A β との反応性をウエスタンブロットにより検討した。実施例 2 で調製した A β 溶液をニトロセルロース膜上にブロット (1ng) したものを 4396C 抗体又は 4G8 抗体とインキュベーションし、その後上記と同様に標識化することにより A β と各抗体との反応性を調べた。同様に、GM1 (和光純薬工業株式会社、大阪、日本) に対する 4396C 抗体の反応性を調べた。比較対照として、4396C 抗体の代わりに POD 標識コレラトキシンサブユニット B (CTX) (シグマ) をインキュベーションした。図 5 B にインキュベーション後のメンブレンの状態を示す。4396C 抗体は可溶性の A β とも GM1 とも全く反応しないことがわかる。

続いて、4396C 抗体と凝集性 A β との反応性を検討した。アルツハイマー病患者の大脳皮質切片を 4% のホルムアルデヒドで固定、パラフィン包埋した後、蟻酸で前処理した。その後、4396C 抗体又は 4G8 抗体で免疫標識した。図 5 C に示されるように、4G8 抗体を用いた場合 (右欄) は神経斑点が強く免疫染色されたが、4396C 抗体を用いた場合 (左欄) では全く染色されなかった。尚、矢印は一連の切片の脈管を示す。

以上の一連の結果より、可溶性 A β から凝集性 A β への過渡的な形態である A β の中間体は A β が GM1 へ結合することにより生ずることが示されるとともに、4396C 抗体は、公知の他の抗 A β 抗体とは異なり、可溶性の A β でも凝集性の A β でもなく GM1 に結合した状態の A β 、即ち GM1-A β を特異的に認識するものであることが明らかとなった。

[実施例 4]

GM1 含有リボソームの存在下におけるアミロイド繊維の形成が、4396C 抗体によって阻害されうるかどうかの検討を試みた。

実施例 2 で調製した A β 溶液及び GM1 含有リボソーム、並びに 4396C 抗体を同

時にインキュベーションし、アミロイド繊維形成を上記の ThT アッセイにより調べた。比較対照として 4396C 抗体の代わりに 4G8 抗体をインキュベーションした。結果を図 6 A に示す。4396C 抗体分子の A β 分子に対する割合は、0.3:50 (Δ)、1.3:50 (\circ)、4:50 (\square) である。また、A β に対する 4G8 抗体分子の A β 分子に対する割合は 4:50 (\diamond) である。■はいずれの抗体も加えずにインキュベーションを行った場合の結果である。図 6 A に示すように、4396C は ThT の蛍光の増加を投与量依存的に阻害した。反対に、他の抗 A β 抗体である 4G8 は蛍光の増加を全く阻害しなかった。

図 6 B は、GM1 含有リポソームの添加に続いて、合成した A β ₁₋₄₀ と 4G8 の混合物を 24 時間同時にインキュベートして免疫電顕を行った結果を示す図である。検体をグリッド上に置き、ウシ血清アルブミンでのブロッキングに続いて金標識抗マウス IgG で直接処理した。尚、横棒は 100nm を表す。この結果から、明らかに 4G8 抗体は新たに形成されたアミロイド繊維の端に結合することがわかる。

[実施例 5] ヒト型キメラ抗体の作製

5-1) ヒト γ 鎖定常領域遺伝子、及びヒト λ 鎖定常領域遺伝子の単離

ヒト γ 鎖定常領域 DNA、及びヒト λ 鎖定常領域 DNA は、ヒトリンパ球 cDNA ライブラリーより各 DNA の一部に相補的な DNA をテンプレートにして取得される。

5-2) キメラ H 鎖ベクター、及びキメラ L 鎖ベクターの作製

まず、ヒト γ 鎖定常領域 DNA と実施例 1 で得られるマウス H 鎖可変領域 DNA とをライゲーションし、これを発現ベクター「BCMGS Neo ベクター」(鳥山「ウシパピローマウイルスベクター」, 村松正実および岡山博人編, 実験医学別冊遺伝子工学ハンドブック, 羊土社, pp.297-299 (1991) に組み込みキメラ H 鎖ベクターを作製する。同様に、ヒト λ 鎖定常領域 DNA と実施例 1 で得られるマウス L 鎖可変領域 DNA とをライゲーションし、これを BCMGS Neo ベクターに組み込

み、キメラ L 鎖ベクターを作製する。

5-3) トランスフェクション

2 種類のベクター（キメラ H 鎖ベクター、キメラ L 鎖ベクター）を CHO（チャイニーズハムスター卵巣）細胞にリポフェクチン法を用いて同時にトランスフェクションし、37℃で所定時間培養した後、96 穴プレートに移植し、ネオマイシン 500 μ g/ml を含む DMEM/10%FCS で選択する。

培養液中の IgG 量は以下のようにして測定する。抗ヒト γ 鎖（株式会社医学生物学研究所：code 103AG）を 10 μ g/ml に PBS で希釈調製し、ポリスチレン製マイクロプレートに 100 μ l/ウェルずつ分注し、4℃で一晩感作させる。次に、5% BSA/5%ショ糖/PBS を用いて 4℃で一晩ブロッキングする。100 μ l のサンプルを 37℃で 1 時間反応させた後、PBS/0.05%Tween20 で洗浄する。洗浄後、4000 倍希釈したペルオキシダーゼ標識抗ヒト IgG（株式会社医学生物学研究所：code 208）を 37℃で 1 時間反応させ、PBS/0.05%Tween20 で洗浄後、酵素基質液を 100 μ l 分注して室温で 15 分反応させる。そして、各ウェルに 2N 硫酸を 100 μ l ずつ分注し、A₄₉₂を測定する。コントロールには、ヒト血清（IgG 量：200ng/ml、20ng/ml、2ng/ml、0.2ng/ml）を用いる。このようにして、最も発現量の多いクローンを選択し、その培養上清を回収する。回収された培養上清より、protein A アガロースカラムを用いて抗体を精製する。

〔実施例 6〕 ヒト型 CDR 移植抗体の作製

6-1) ヒト型 CDR 移植抗体の設計

H 鎖及び L 鎖について、公知のデータベース（例えば、Fasta database search）より 4396C 抗体の H 鎖及び L 鎖とホモロジーの高い配列をそれぞれ選択する。そして、これらの配列の FR と 4396C 抗体の CDR を備える配列を設計する。

6-2) ヒト型 CDR 移植抗体発現ベクターの作製

6-1) で設計された H 鎖可変領域 DNA 及び L 鎖可変領域 DNA は次のよう

に作製することができる。

最初に、合成 DNA を図 7 に示すように 8 本作製した。これら合成 DNA は可変領域の約 400bp をカバーし、且つそれぞれ約 20bp ずつオーバーラップするように作製されている。これら合成 DNA 10pmol/10 μ l を 100℃ で 5 分処理した後、

5 急冷し、合成 DNA の 1 と 2、3 と 4、5 と 6、7 と 8 をそれぞれ混ぜ、ヒートブロックで 65℃、30 分加熱したのち、12 時間放置し、ゆっくりとアニールさせる。次に、20mM dNTP を 1 μ l、シーケナーゼ（アマシャム社）1 μ l、5×シーケナーゼバッファー 10 μ l を加え、滅菌水で最終的に 50 μ l とし、37℃、1 時間インキュベートする。この DNA フラグメント（1-2、3-4、5-6、7-8）を 2% アガロース
10 で泳動し、切り出し、30 μ l の滅菌水に溶解する。次に、切り出した DNA フラグメント 1-2 と 3-4、5-6 と 7-8、それぞれ 2 μ l に、Pfu ポリメラーゼ 1 μ l、DMSO 5 μ l、10×Pfu バッファー 9 μ l を加え、滅菌水を加え 90 μ l としたのち、PCR を 94℃ 1 分、55℃ 1 分、72℃ 2 分の条件で 6 サイクル行う。次に、10×バッファー 1 μ l、20 μ M プライマー（a と b、または c と d）をそれぞれ 5 μ l 加え、PCR をさらに 94℃ 1
15 分、55℃ 1 分、72℃ 2 分で 25 サイクル行う。増幅された DNA フラグメント（1-2-3-4 と 5-6-7-8）を切り出し、30 μ l の滅菌水に溶解し、それぞれの DNA 2 μ l を用いて PCR を前述の条件で 6 サイクル行い、プライマー e、f を加えてさらに PCR を前述の条件で 25 サイクル行う。得られた DNA フラグメントを切り出し、pT7blueT ベクターにクローニングし、配列を確認する。

20 次に、実施例 5 と同様に、発現ベクターである「BCMGS Neo ベクター」と、PCR にて制限酵素サイトを付けた合成 H 鎖可変領域 DNA と、ヒト γ 鎖 DNA とをライゲーションし、CDRH 鎖ベクターを作製する。同様に、合成 L 鎖可変領域 DNA とヒト λ 鎖 DNA とが組込まれた CDRL 鎖ベクターを作製する。

6-3) トランスフェクション

25 CDRH 鎖ベクター及び CDRL 鎖ベクターを CHO 細胞にリポフェクション法を用

いて同時にトランスフェクションし、37℃、12時間培養した後、96穴プレートにまき直し、ネオマイシン 500 μ g/ml を含む DMEM/10% FCS で選択する。その後、ELISA にて最も発現量の多いクローンを選択する。培養上清を回収し、Protein A アガロースカラムを用いて抗体を精製する。

- 5 この発明は、上記発明の実施の形態及び実施例の説明に何ら限定されるものではない。特許請求の範囲の記載を逸脱せず、当業者が容易に想到できる範囲で種々の変形態様もこの発明に含まれる。

産業上の利用の可能性

- 10 本発明により、これまでに知られているアミロイド β タンパク質に対する抗体とは異なり、可溶性のアミロイド β タンパク質ではなく GM1 ガングリオシド結合型アミロイド β タンパク質を認識し、アミロイド繊維の形成を抑制する活性を有する抗体の情報（アミノ酸配列、DNA 配列）が提供される。また、当該活性を有する抗体（抗体断片を含む）が提供される。特に、CDR の情報を基にヒト化抗体の作製が可能となる。これらの抗体は、アルツハイマー病の診断、予防、治療に有効な手段となる。
- 15

請 求 の 範 囲

1. 重鎖可変領域が a)～c)の少なくとも一つの領域を有し、

GM1 ガングリオシド結合型アミロイド β タンパク質を認識し、アミロイド繊維
5 の形成を抑制する活性を有する抗体、

a)配列番号：1に記載されるアミノ酸配列、又は該アミノ酸配列の一部を改変
したアミノ酸配列からなる第1領域、

b)配列番号：2に記載されるアミノ酸配列、又は該アミノ酸配列の一部を改変
したアミノ酸配列からなる第2領域、

10 c)配列番号：3に記載されるアミノ酸配列、又は該アミノ酸配列の一部を改変
したアミノ酸配列からなる第3領域。

2. 軽鎖可変領域が d)～e)の少なくとも一つの領域を有し、

GM1 ガングリオシド結合型アミロイド β タンパク質を認識し、アミロイド繊維
15 の形成を抑制する活性を有する抗体、

d)配列番号：4に記載されるアミノ酸配列、又は該アミノ酸配列の一部を改変
したアミノ酸配列からなる第4領域、

e)配列番号：5に記載されるアミノ酸配列、又は該アミノ酸配列の一部を改変
したアミノ酸配列からなる第5領域、

20 f)配列番号：6に記載されるアミノ酸配列、又は該アミノ酸配列の一部を改変
したアミノ酸配列からなる第6領域。

3. 重鎖可変領域が g)～i)の CDR を有し、かつ軽鎖可変領域が j)～l)の CDR
を有し、

25 GM1 ガングリオシド結合型アミロイド β タンパク質を認識し、アミロイド繊維

の形成を抑制する活性を有する抗体、

g) 配列番号：1 に記載されるアミノ酸配列、又は該アミノ酸配列の一部を改変したアミノ酸配列からなる CDR1、

5 h) 配列番号：2 に記載されるアミノ酸配列、又は該アミノ酸配列の一部を改変したアミノ酸配列からなる CDR2、

i) 配列番号：3 に記載されるアミノ酸配列、又は該アミノ酸配列の一部を改変したアミノ酸配列からなる CDR3、

j) 配列番号：4 に記載されるアミノ酸配列、又は該アミノ酸配列の一部を改変したアミノ酸配列からなる CDR1、

10 k) 配列番号：5 に記載されるアミノ酸配列、又は該アミノ酸配列の一部を改変したアミノ酸配列からなる CDR2、

l) 配列番号：6 に記載されるアミノ酸配列、又は該アミノ酸配列の一部を改変したアミノ酸配列からなる CDR3。

15 4. 重鎖可変領域が配列番号：7 に記載されるアミノ酸配列、又は該アミノ酸配列の一部を改変したアミノ酸配列からなり、

GM1 ガングリオシド結合型アミロイド β タンパク質を認識し、アミロイド繊維の形成を抑制する活性を有する抗体。

20 5. 軽鎖可変領域が配列番号：8 に記載されるアミノ酸配列、又は該アミノ酸配列の一部を改変したアミノ酸配列からなり、

GM1 ガングリオシド結合型アミロイド β タンパク質を認識し、アミロイド繊維の形成を抑制する活性を有する抗体。

25 6. 重鎖可変領域が配列番号：7 に記載されるアミノ酸配列、又は該アミノ酸

配列の一部を改変したアミノ酸配列からなり、

軽鎖可変領域が配列番号：8に記載されるアミノ酸配列、又は該アミノ酸配列の一部を改変したアミノ酸配列からなり、

5 GM1 ガングリオシド結合型アミロイド β タンパク質を認識し、アミロイド繊維の形成を抑制する活性を有する抗体。

7. ヒト化抗体である、請求の範囲第1項～第6項のいずれかに記載の抗体。

8. Fab、Fab'、F(ab')₂、scFv、又は dsFv 抗体である、請求の範囲第1項～
10 第7項のいずれかに記載の抗体。

9. 請求の範囲第1項～第8項のいずれかに記載の抗体をコードする DNA。

10. 請求の範囲第1項、第3項、第4項、第6項、第7項、又は第8項に記
15 載される抗体の重鎖可変領域をコードする DNA。

11. 配列番号：9の塩基配列からなる、請求の範囲第10項に記載の DNA。

12. 請求の範囲第10項又は第11項に記載の DNA を含む、抗体重鎖をコー
20 ドする DNA。

13. 請求の範囲第2項、第3項、第5項、第6項、第7項、又は第8項に記
載される抗体の軽鎖可変領域をコードする DNA。

25 14. 配列番号：10の塩基配列からなる、請求の範囲第13項に記載の DNA。

15. 請求の範囲第13項又は第14項に記載のDNAを含む、抗体軽鎖をコードするDNA。

5 16. 配列番号：1のアミノ酸配列をコードするDNA。

17. 配列番号：2のアミノ酸配列をコードするDNA。

18. 配列番号：3のアミノ酸配列をコードするDNA。

10

19. 配列番号：4のアミノ酸配列をコードするDNA。

20. 配列番号：5のアミノ酸配列をコードするDNA。

15 21. 配列番号：6のアミノ酸配列をコードするDNA。

22. 請求の範囲第9項～第21項のいずれかに記載のDNAを発現可能に含有するベクター。

20 23. 請求の範囲第10項～第12項のいずれかに記載のDNA、及び請求の範囲第13項～第15項のいずれかに記載のDNAを発現可能に含有するベクター。

24. 請求の範囲第22項又は第23項に記載のベクターで形質転換された形質転換体。

25. 請求の範囲第10項～第12項のいずれかに記載のDNAを発現可能に含有するベクター、及び請求の範囲第13項～第15項のいずれかに記載のDNAを発現可能に含有するベクターで共形質転換された形質転換体。

- 5 26. 請求の範囲第24項又は第25項に記載の形質転換体を培養する工程、及び発現された抗体を回収する工程を含む、抗体の製造方法。

要 約 書

アルツハイマー病の診断、予防、又は治療に有効な抗体及びこれをコードする DNA、並びに薬剤のスクリーニング方法、及び薬剤を提供する。

- 5 アミロイド繊維形成初期に生ずる GM1 ガングリオシド結合型アミロイド β タンパク質を特異的に認識する抗体の可変領域のアミノ酸配列及び遺伝子配列を決定する。得られたアミノ酸配列及び遺伝子配列の情報を基に抗体をデザインする。

Fig. 1

Filename : A β antibody heavy chain variable region
Sequence Size : 408
Sequence Position: 1 - 408

signal sequence

10 20 30 40 50 60
ATGGGATGGATCTGGATCTTTCTCTTCCTCCTGTCAGGAACTGCAGGTGTCCACTCTGAG
M G W I W I F L F L L S G T A G V H S E

70 80 90 100 110 120
GTCCAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGAGCTAGTGAAGACTGGGGCTTCAGTGAAGATATCC
V Q L Q Q S G P E L V K T G A S V K I S

CDR1

130 140 150 160 170 180
TGCAAGGCTTCTGGTTACTCATTCACTGGTTACTACATGCACITGGGTCAAGCAGAGCCAT
C K A S G Y S F T G Y Y M H W V K Q S H

CDR2

190 200 210 220 230 240
GGAAAGAGCCTTGAGTGGATTGGATATATTAGTTGTTACAATGGTGCTACTAGCTACAAC
G K S L E W I G Y I S C Y N G A T S Y N

250 260 270 280 290 300
CAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACATTTACTGTAGACACATCCTCCAGCACAGCCTACATG
Q K F K G K A T F T V D T S S S T A Y M

CDR3

310 320 330 340 350 360
CAGTTCAACAGCCTGACATCTGAAGACTCTGCGGTCTATTACTGTGCAAGAGGGGGCTAAC
Q F N S L T S E D S A V Y Y C A R G A N

370 380 390 400
TGGGTCTTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA
W V F D Y W G Q G T T L T V S S

Fig. 2

Filename : A β antibody light chain variable region
Sequence Size : 387
Sequence Position: 1 - 387

signal sequence

10 20 30 40 50 60
ATGGCCTGGACTTCACTTATACTCTCTCTCCTGGCTCTCTGCTCAGGAGCCAGTTCCTCCAG
M A W T S L I L S L L A L C S G A S S Q

70 80 90 100 110 120
GCTGTTGTGACTCAGGAATCTGCACTCACCACATCACCTGGTGGAAACAGTCATACTCACT
A V V T Q E S A L T T S P G G T V I L T

CDR1

130 140 150 160 170 180
TGTCGCTCAAGTACTGGGGCTGTTACAAGTAGTAAGTATGCCAACTGGGTCCAAGAAAAA
C R S S T G A V T T S N Y A N W V Q E K

CDR2

190 200 210 220 230 240
CCAGATCATTTATTCACTGGTCTAATAGGTGGTACCAGCAACCGAGCTCCAGGTGTTTCCT
P D H L F T G L I G G T S N R A P G V P

250 260 270 280 290 300
GTCAGATTCTCAGGCTCCCTGATTGGAGACAAGGCTGCCCTCACCATCACAGGGGCACAG
V R F S G S L I G D K A A L T I T G A Q

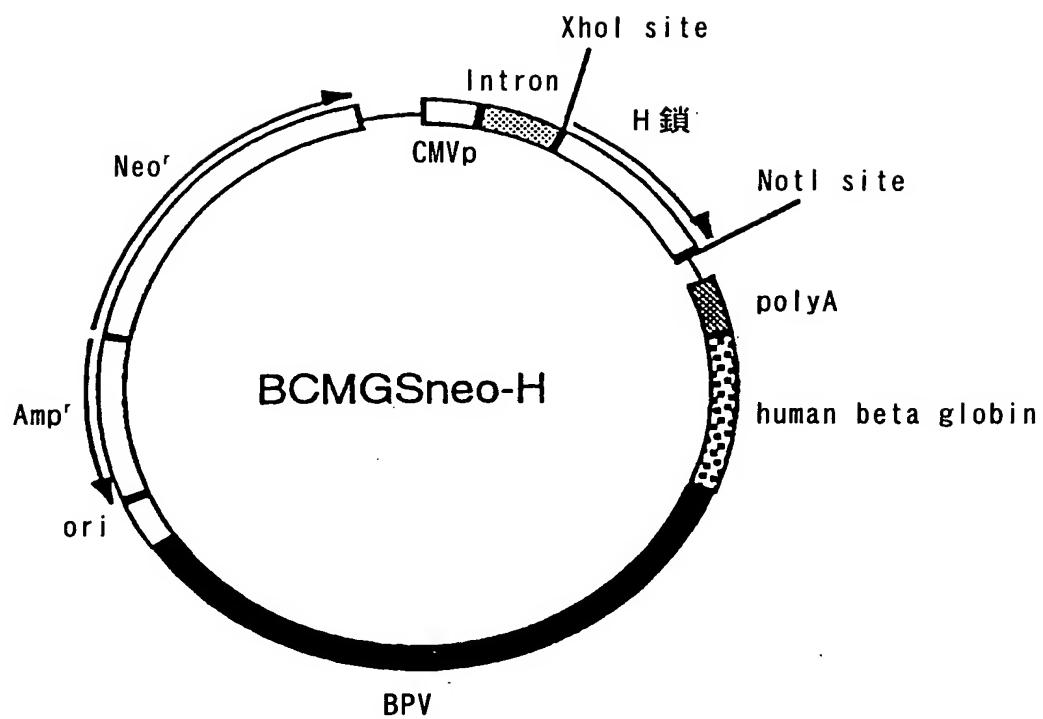
CDR3

310 320 330 340 350 360
ACTGAGGATGATGCAATGTATTTCTGTGCTCTATGGTACAGCACCCATTATGTTTCGGC
T E D D A M Y F C A L W Y S T H Y V F G

370 380
GGTGGAAACCAAGGTCAGTGTCTAGGT
G G T K V T V L G

Fig. 3

(A)



(B)

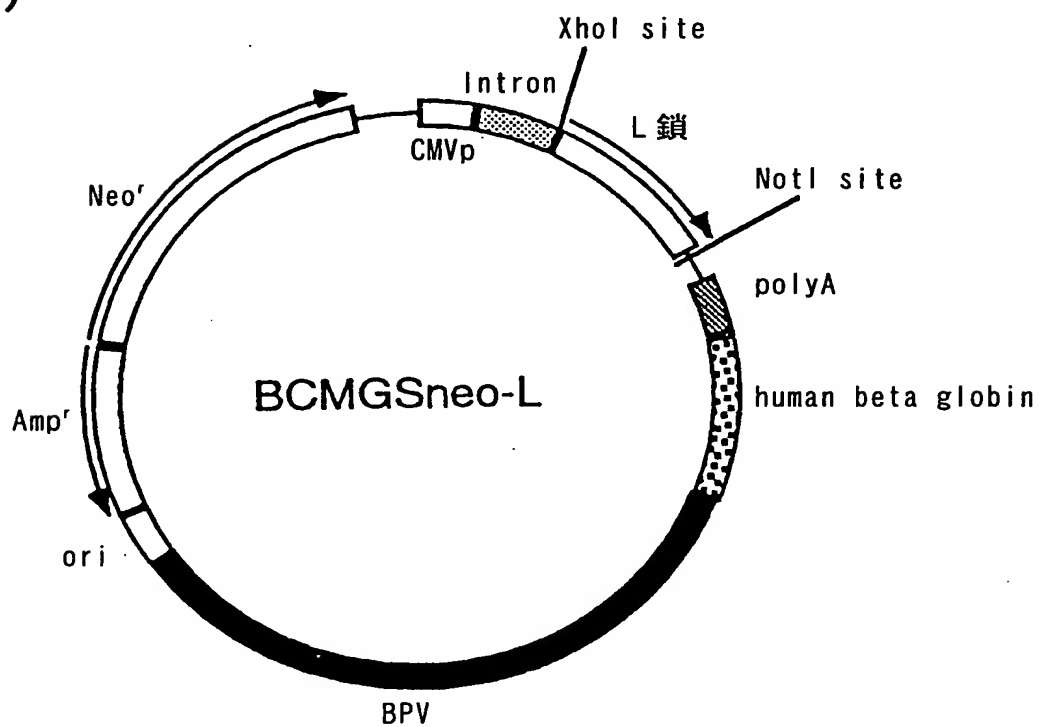


Fig. 4

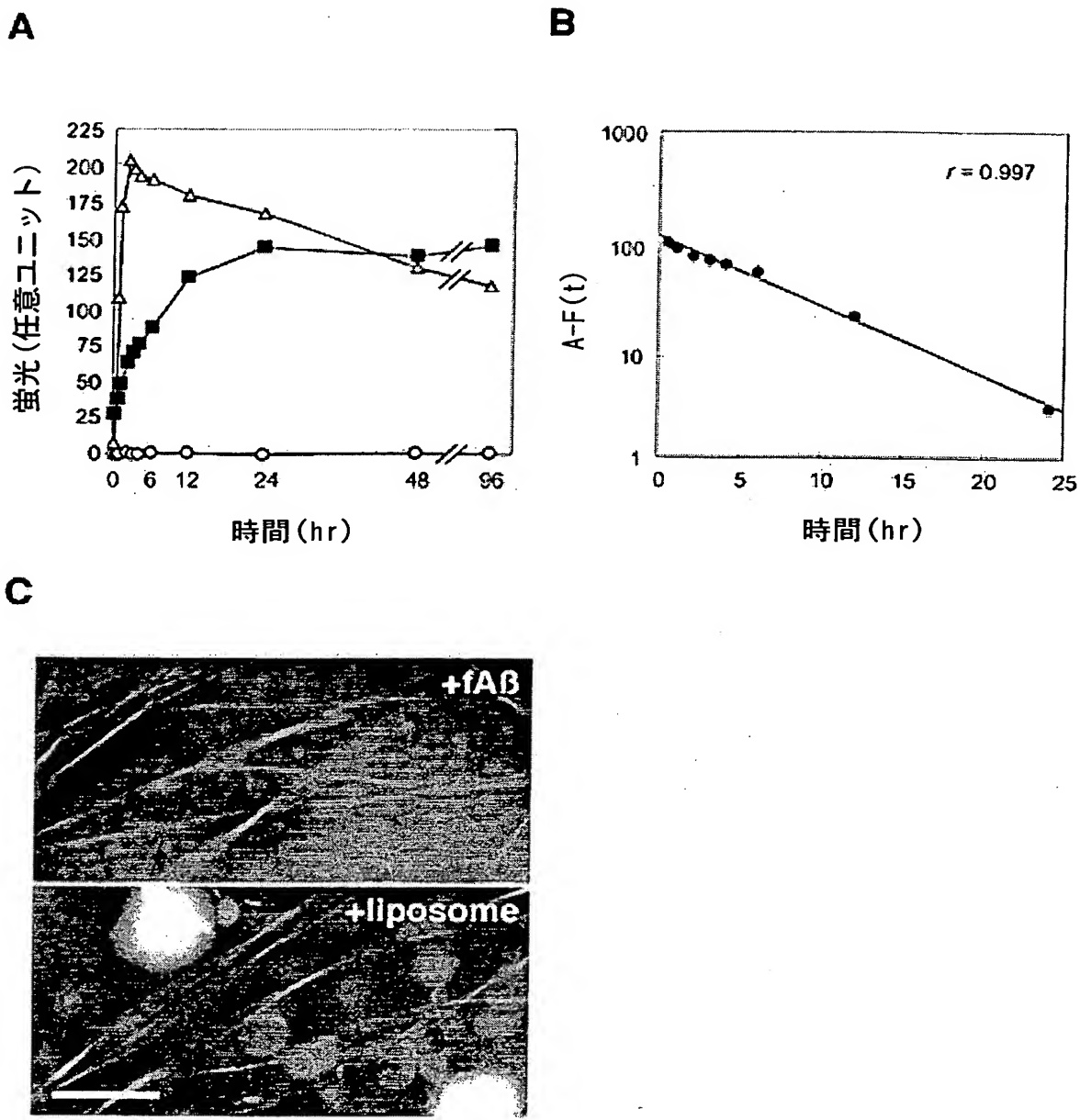


Fig. 5

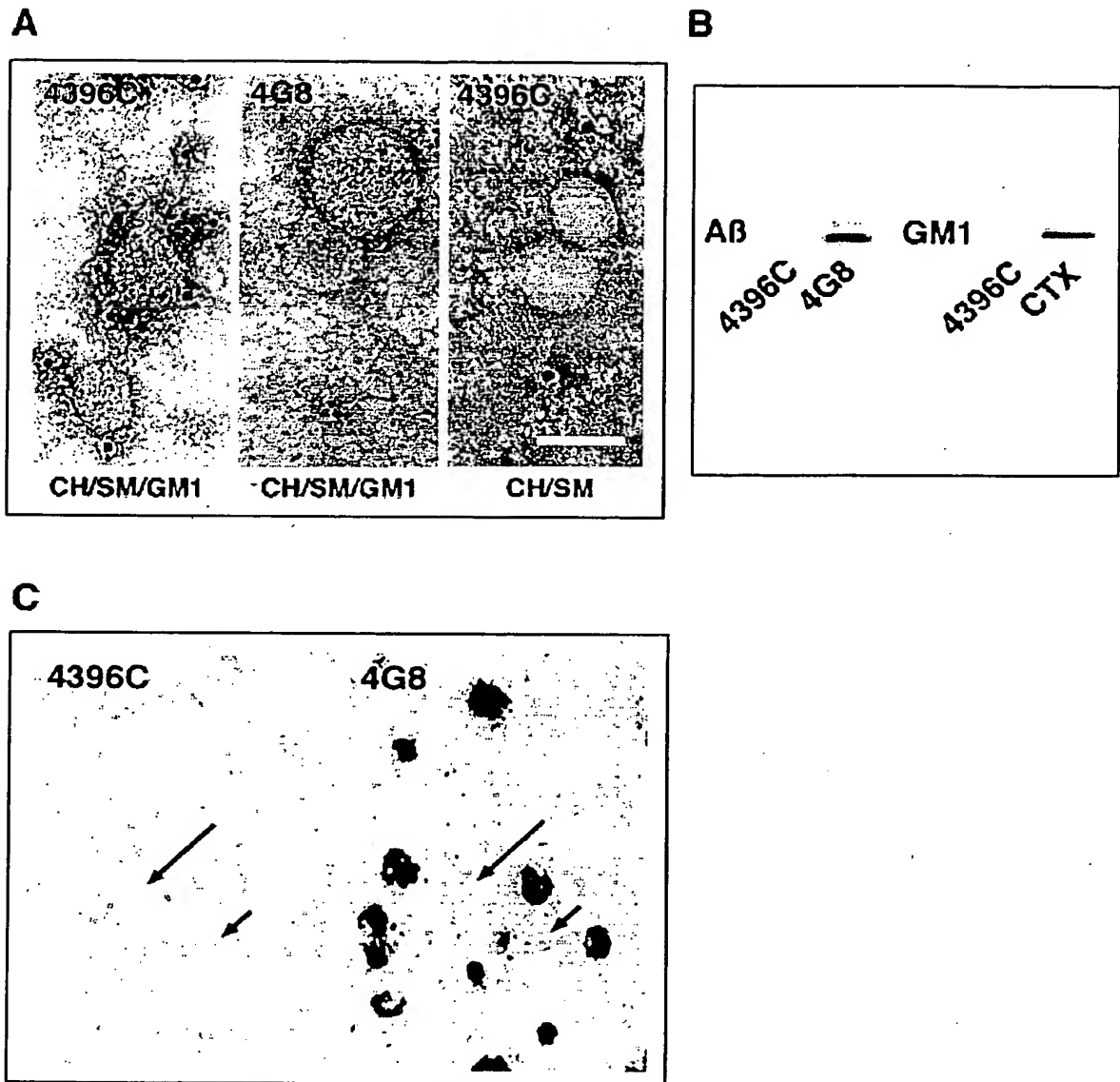
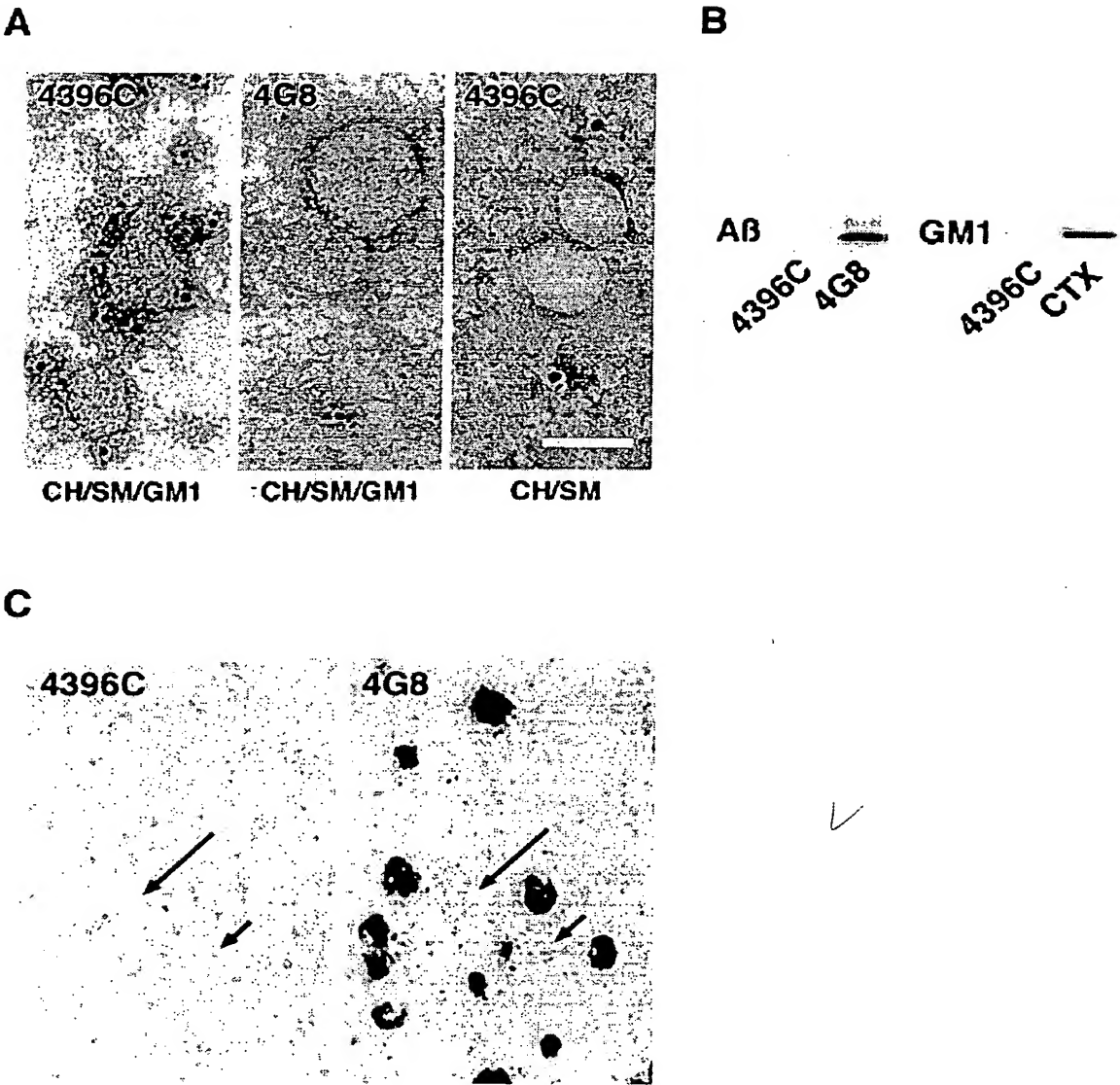


Fig. 5



6/7

Fig. 6

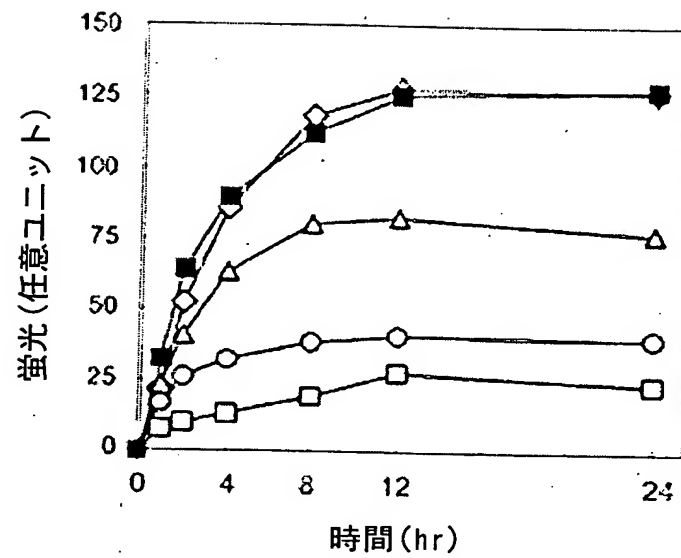
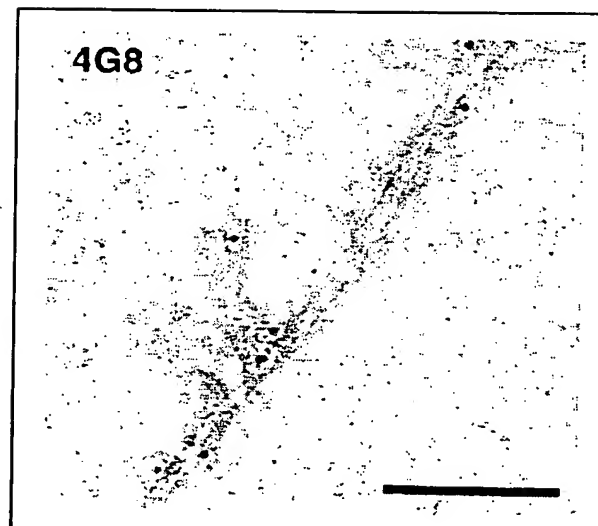
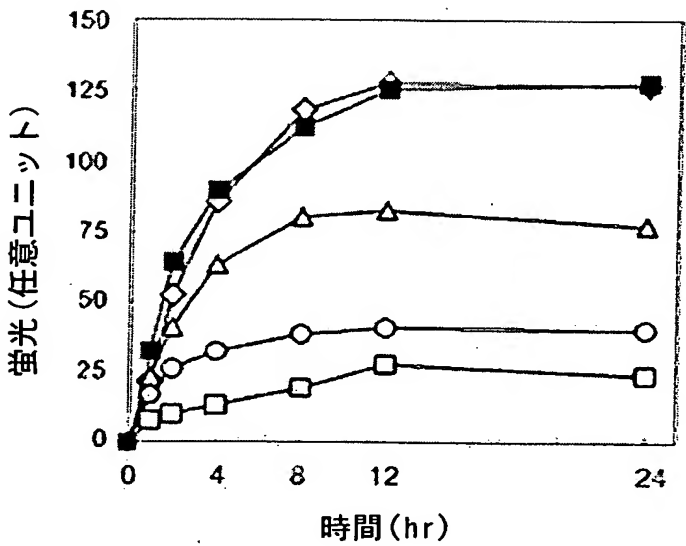
A**B**

Fig. 6

A



B

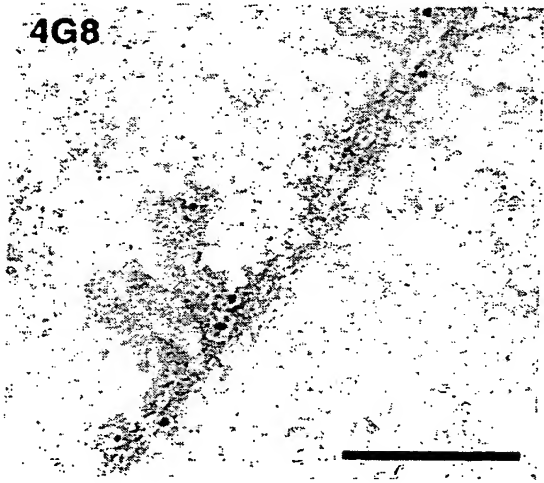
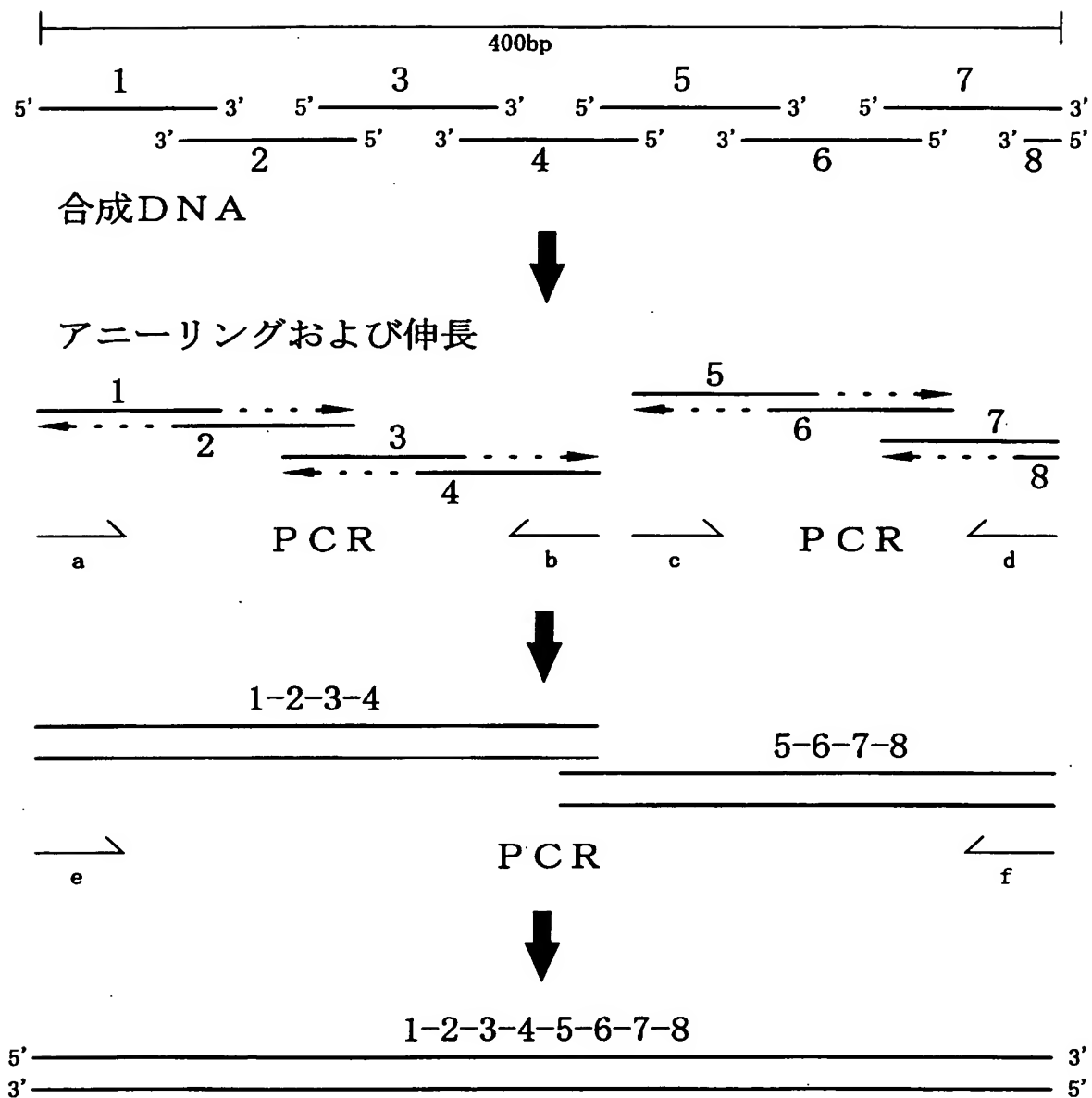


Fig. 7



SEQUENCE LISTING

<110> MEDICAL & BIOLOGICAL LABORATORIES CO., LTD.

The director of Chubu National Hospital

YANAGISAWA, Katsuhiko

SHIBATA, Masao

<120> Antibody which recognizes GM1 ganglioside-bound
amyloid b-protein, and DNA encoding thereof.

<130> P0102401

<140>

<141>

<150> JP P2001-235700

<151> 2001-08-03

<160> 16

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 1

Gly Tyr Tyr Met His

1

5

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 2

Tyr Ile Ser Cys Tyr Asn Gly Ala Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys

1

5

10

15

Gly

2/7

<210> 3
<211> 8
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 3
Gly Ala Asn Trp Val Phe Asp Tyr
1 5

<210> 4
<211> 14
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 4
Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Asn
1 5 10

<210> 5
<211> 7
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 5
Gly Thr Ser Asn Arg Ala Pro
1 5

<210> 6
<211> 9
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 6
Ala Leu Trp Tyr Ser Thr His Tyr Val
1 5

<210> 7
<211> 136
<212> PRT
<213> Mus musculus

3/7

<400> 7

Met Gly Trp Ile Trp Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Gly Thr Ala Gly
 1 5 10 15

Val His Ser Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys
 20 25 30

Thr Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe
 35 40 45

Thr Gly Tyr Tyr Met His Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu
 50 55 60

Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Ser Cys Tyr Asn Gly Ala Thr Ser Tyr Asn
 65 70 75 80

Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Phe Thr Val Asp Thr Ser Ser Ser
 85 90 95

Thr Ala Tyr Met Gln Phe Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
 100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Ala Asn Trp Val Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
 115 120 125

Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
 130 135

<210> 8

<211> 129

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 8

Met Ala Trp Thr Ser Leu Ile Leu Ser Leu Leu Ala Leu Cys Ser Gly
 1 5 10 15

Ala Ser Ser Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Ser Ala Leu Thr Thr Ser
 20 25 30

Pro Gly Gly Thr Val Ile Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val
 35 40 45

Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Asp His Leu

4/7

50	55	60
Phe Thr Gly Leu Ile Gly Gly Thr Ser Asn Arg Ala Pro Gly Val Pro		
65	70	75 80
Val Arg Phe Ser Gly Ser Leu Ile Gly Asp Lys Ala Ala Leu Thr Ile		
	85	90 95
Thr Gly Ala Gln Thr Glu Asp Asp Ala Met Tyr Phe Cys Ala Leu Trp		
100	105	110
Tyr Ser Thr His Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu		
115	120	125

Gly

<210> 9
 <211> 408
 <212> DNA
 <213> Mus musculus

<220>
 <221> sig_peptide
 <222> (1).. (57)

<220>
 <221> V_region
 <222> (1).. (408)

<400> 9
 atgggatgga tctggatcct tctcttctc ctgtcaggaa ctgcagggtgt ccactctgag 60
 gtccagctgc agcagctctgg acctgagcta gtgaagactg gggcttcagt gaagatatcc 120
 tgcaaggcct ctggttactc attcactggt tactacatgc actgggtcaa gcagagccat 180
 ggaaagagcc ttgagtggat tggatatatt agttgttaca atggtgctac tagctacaac 240
 cagaagtica agggcaaggc cacatttact gtagacacat cctccagcac agcctacatg 300
 cagttcaaca gcctgacatc tgaagactct gcggtctatt actgtgcaag aggggctaac 360
 tgggtctttg actactgggg ccaaggcacc actctcacag tctctca 408

<210> 10
 <211> 387
 <212> DNA
 <213> Mus musculus

5/7

<220>

<221> sig_peptide

<222> (1)..(57)

<220>

<221> V_region

<222> (1)..(387)

<400> 10

```

atggcctgga cttcacttat actctctctc ctggctctct gctcaggagc cagttcccag 60
gctgttgtga ctcaggaatc tgcactcacc acatcacctg gtggaacagt catactcact 120
tgtcgctcaa gtactggggc tgttacaact agtaactatg ccaactgggt ccaagaaaaa 180
ccagatcatt tattcactgg tctaataagg ggtaccagca accgagctcc aggtgttcct 240
gtcagattct caggctccct gattggagac aaggctgccc tcaccatcac aggggcacag 300
actgaggatg atgcaatgta tttctgtgct ctatggtaca gcaccatta tgttttcggc 360
ggtggaacca aggtcactgt cctaggt                                     387

```

<210> 11

<211> 15

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> V_segment

<222> (1)..(15)

<400> 11

ggttactaca tgcac

15

<210> 12

<211> 51

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> V_segment

<222> (1)..(51)

<400> 12

tatattagtt gttacaatgg tgctactagc tacaaccaga agttcaaggg c

51

6/7

<210> 13
<211> 24
<212> DNA
<213> Mus musculus

<220>
<221> V_segment
<222> (1)..(24)

<400> 13
ggggctaact gggctcttga ctac

24

<210> 14
<211> 42
<212> DNA
<213> Mus musculus

<220>
<221> V_segment
<222> (1)..(42)

<400> 14
cgctcaagta ctggggctgt tacaactagt aactatgcca ac

42

<210> 15
<211> 21
<212> DNA
<213> Mus musculus

<220>
<221> V_segment
<222> (1)..(21)

<400> 15
ggtaccagca accgagctcc a

21

<210> 16
<211> 27
<212> DNA
<213> Mus musculus

<220>

7/7

<221> V_segment

<222> (1)..(27)

<400> 16

gctctatggt acagcaccca ttaigtt

27